

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テーマコード* (参考)
C 1 2 M 1/36		C 1 2 M 1/36	
1/00		1/00	A
C 1 2 Q 1/68		C 1 2 Q 1/68	A
G 0 1 N 35/04		G 0 1 N 35/04	A
// G 0 1 N 33/50		33/50	P
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 64 頁) 最終頁に続く			
(21)出願番号	特願平9-517420	(71)出願人	サーノフ コーポレイション アメリカ合衆国 ニュージャージー州 プ リンストン シーエヌ5300 ワシントン ロード 201
(86) (22)出願日	平成8年11月1日(1996.11.1)	(72)発明者	アンドレフスキ, ズィグマント, エム. アメリカ合衆国 ニュージャージー州 プ リンストン スノーデン レーン 151
(85)翻訳文提出日	平成10年5月6日(1998.5.6)	(72)発明者	ローチ, ウィリアム, アール. アメリカ合衆国 ニュージャージー州 ロ ッキー ヒル ヒッコリー コート 70
(86)国際出願番号	P C T / U S 9 6 / 1 7 1 1 6	(74)代理人	弁理士 長谷川 芳樹 (外6名)
(87)国際公開番号	W O 9 7 / 1 6 5 6 1		
(87)国際公開日	平成9年5月9日(1997.5.9)		
(31)優先権主張番号	6 0 / 0 0 9 , 5 1 7		
(32)優先日	平成7年11月3日(1995.11.3)		
(33)優先権主張国	米国 (U S )		
最終頁に続く			

(54)【発明の名称】 アッセイシステムおよびアッセイを実施する方法

(57)【要約】

本発明は、反応チャンバー内で流体密閉の方法で高温反応を行うアッセイシステムに関し、そのアッセイシステムは、（a）反応チャンバーを包含する第一のアセンブリーおよび（b）温度制御のための第二のアセンブリー（ここで、第二のアセンブリーは、反応チャンバーに隣接して位置決めされ得る）を包含する。さらに詳細には、本発明は、（a）変形可能な材料から形成されるカバーを有する反応チャンバーおよび（b）反応チャンバーの温度を迅速に調節するための機構を包含するアッセイシステムに関する。

**【特許請求の範囲】**

1. 反応チャンバー内で流体密閉の手段で (in a fluid-tight manner) 温度の上昇した反応 (elevated temperature reactions) を実施するアッセイシステムであって、

(a) 該反応チャンバーを包含する第一のアセンブリーと、(b) 温度制御のための第二のアセンブリーとを含み、且つ、該第二のアセンブリーは、反応チャンバーに隣接して (adjacent to) 位置決めされ得るアッセイシステム。

2. さらに、第一のアセンブリーと接触して滑らせて位置決め (slideably positioned) でき、そして複数の流体チャンバーを含む第三のアセンブリーを包含し、且つ、各流体チャンバーが流体交換ポートを有し、該流体交換ポートの複数の、第一のアセンブリーに関して第三のアセンブリーを滑らして位置決めすることによって、第一の流体交換チャンネルと一列に並べる (aligned with) ことができる請求項1に記載のアッセイシステム。

3. さらに、第一の流体交換チャンネルと一列に並べることができる流体交換ポートを有する流体チャンバーから、配列された第一の流体交換チャンネルの反応チャンバーに流体を流させる第一の流体回転翼 (fluid impeller) を包含する請求項2に記載のアッセイシステム。

4. さらに、反応チャンバーに流体を残させる (leave) ための第二の流体回転翼を包含し、且つ、第一のアセンブリーが、第一の流体交換チャンネルが第三のアセンブリー中の流体交換チャンネルと一列に並んでいない場合に、流体が第一の流体交換チャンネルを通して流れないように、流体密閉で、滑らし可能な手段で第三のアセンブリー内に適合する (fits) 請求項3に記載のアッセイシステム。

5. さらに、第三のアセンブリーまたは第一のアセンブリーを滑らせるためのスライダーと、

(a) 第三のアセンブリーまたは第一のアセンブリーの滑動、および (b) 流体を流体チャンバーから反応チャンバーに流させるための第一の流体回転翼を制御するためのプロセッサと、

を包含する請求項2に記載のアッセイシステム。

6. 請求項1に記載のアッセイシステムの第一の反応チャンバーにサンプルを導入し、そして1つまたはそれ以上の流体チャンバーから、PCR反応を実施するのに必要な試薬を含有する第一の反応チャンバー溶液に移動させることを包含するPCR反応を実施する方法。

7. 前記第二のアセンブリーが、約5秒以内で約25℃から約75℃の温度に上昇させる請求項6に記載の方法。

8. 前記第二のアセンブリーが、約5秒以内で約75℃から約50℃の温度に低下させる請求項6に記載の方法。

9. 反応チャンバーの温度を迅速に調節するための機構を有し、  
前記アッセイシステムが (a) 第一および第二のカバーを有し、および第一および第二のカバーの間の距離によって定義される厚みを示す反応チャンバーを包含する第一のアセンブリーと、 (b) 熱源、冷却槽および第二の構成要素の表面で開く複数の加圧流体チャンネルを包含する第二のアセンブリーと、 (c) 該加圧流体チャンネル内で液圧を制御するための圧力コントローラーとを包含し、  
該第二のアセンブリーが、加圧流体チャンネルが反応チャンバーのカバーと接触しているように反応チャンバーに隣接して位置決めできるものであるアッセイシステム。

10. 前記熱源が、第二のアセンブリーに付随した (attached to) 少なくとも1つの電氣的加熱器を包含し、且つ、前記冷却槽が、第二のアセンブリーに不可欠な (integral) 水または他の流体のための導管と、該導管を通して流体を流れさせるための流体回転翼とを包含する請求項9に記載のシステム。

11. (a) 変形できる材料から形成されたカバーを有す反応チャンバーと、  
(b) 該反応チャンバーの温度を迅速に調節するための機構とを包含し、  
該機構が、 (i) 第一および第二の末端板 (該第一の末端板は、該反応チャンバーカバーと接触して位置決めできる) と、  
(i i) 第一および第二の末端板の間に位置決めされ、且つ熱電氣的 (thermoelectric) 熱ポンプを形成するように電氣的に直列に繋がった複数の対のp型およびn型の半導体ブロックとを包含し、

前記熱ポンプが、直列に繋がった半導体ブロックを横切って (across) 第一の極性の電流が印加された際には、第一末端板から第二末端板に熱を送り (pumps heat) ; 該直列に繋がった半導体ブロックを横切って、該第一の極性と反対の極性の電流が印加された際には、第二末端板から第一末端板に熱を送るアッセイシステム。

**【発明の詳細な説明】****アッセイシステムおよびアッセイを実施する方法**

本発明は、契約番号70NANB5H1037として米国政府支援の下になされた。米国政府は、この発明に一定の権利を有する。

本発明は、特異的化学アッセイの分野、そして特にこのようなアッセイを実施するシステムおよび方法に関する。

犯罪法化学および医学上の診断に有用な科学的アッセイは、例えば、痕跡量のDNAを分析するのに非常に有益であることが立証されているポリメラーゼ連鎖反応（「PCR」）のような生化学的手段にますます関連してきた。特に、PCRアッセイは、定義された核酸のセグメントまたはそのような定義されたセグメントに高度に相同性のあるセグメントのいずれかの存在をアッセイする強力な方法を提供してきた。その方法は、ライム病、HIVウイルスまたは他の病原性微生物を引起す微細細菌のような特定の病原に特異的な核酸の存在について体液をアッセイするのに使用できる。微生物診断アッセイは、微生物ゲノム由来の標的セグメントを含みうるサンプルに、核酸の標的セグメントに特異的に結合する（すなわち、にハイブリダイズする）2つの「プライマー」（すなわち、比較的短い核酸セグメントまたは核酸類似体）を添加することによって、機能する。第一のプライマーは、二本鎖標的核酸セグメントの第一の鎖に結合し、そしてハイブリダイズされた場合に、下流方向として任意に設計された方向に標的核酸セグメントの第二の鎖のコピーの酵素的な再生をプライムできる。第二のプライマーは、第一のプライマーハイブリダイゼーション部位から下流の位置に核酸セグメントの第二の鎖に結合し、そして上流方向にその標的核酸セグメントの第一の鎖を酵素的な再生をプライムできる。（サンプルが一本鎖標的核酸から形成される場合に、第二のプライマーは、ワトソン-クリック塩基対法則で決定される理論的な第二の鎖とハイブリダイズする。）そのサンプルに、核酸の単量体結合ブロック、および短いプライマーが結合される核酸の一本鎖からの核酸再生を特異的に触媒する酵素を添加する。その酵素は、高温による破壊に高度に耐性があることが好ましい。サンプルはDNA融解温度まで加熱されて、サンプル核酸の2つの鎖に分離され、そしてその後複製温度に冷却される。複製温度は、プライマー

を、分離した鎖に特異的に結合させ、そして再生性酵素を操作させる。このサイクルの後、反応混合物は、元々存在した各標的核酸セグメントに対する2つの標準核酸セグメントの2つの組を含む。十分量の核酸セグメントがこの対数増殖再生法によって作製されるまで、加熱および複製温度のサイクルを反復する。例えば、20サイクル後、セグメントは、220倍あるいはおよそ1,000,000倍と同じくらい多く複製された。そのPCR法は、図9に図示される。

PCR反応を自動制御するのに関連していくつかの問題がある。第一に、そのアッセイによって達成されるその程度の複製は、研究室の機器に結合して不注意に混合されたサンプルまたはオリゴヌクレオチドからの大きな汚染の危険を生じさせる。今までのところ、この危険は、建設しそして維持するのに非常に費用がかかる「クリーン」施設で反応を実施することによって市販のまたは手動の手段で対処されてきた。自動制御については、この危険は、複製のために必要とされる全ての試薬および反応チャンバーが、制御された1回の操作でサンプルを挿入できる使い捨てできるプラットフォームに含まれること、およびサンプル製造段階が最小限にされ、そして起こり得る範囲まで、使い捨てプラットフォームの範囲内で操作されることを意味している。

第二に、高い温度が、核酸を「融解」するのに必要とされて、その結果、二本鎖を分離することは、反応チャンバーが種々の試薬液を挿入させまたは除去させる場合でさえ、蒸気損失に対して十分に封印されていなければならないことを意味する。

第三に、反応は、高価な試薬を保存するために、そしてサンプルの量を最小限にするために約100  $\mu$  l以下で比較的少量で、操作されなければならない。そのサンプルは、他のタイプの試験のために見越して保存され、そして少量でのみ入手できる貴重なサンプル液または組織である可能性がある。

本発明は、流体の反応チャンバーに挿入しそしてその外に排除することを制御するための効果的で流体密閉のバルブを有する小規模で使い捨てできる装置を提供することにより、現在の方法において存在する難点に対する解決策を提供する。

発明の要旨

本発明は、反応チャンバー内で流体密閉の手段で温度が上昇した反応を操作するためのアッセイシステムである。ここで、このアッセイシステムは、反応チャンバーを包含する第一のアセンブリおよび温度制御のための第二のアセンブリを包含する。ここで、第二のアセンブリは、反応チャンバーに隣接して位置決めできる。

本発明は、サンプルを、本発明のアッセイシステムの第一の反応チャンバーに導入すること、および1つまたはそれ以上の流体チャンバーから、PCR反応を操作するために必要な試薬を含有する第一の反応チャンバー溶液を移動するを包含するPCR反応を操作する方法でもある。

#### 図面の簡単な説明

本発明の教示は、添付の図面に関連した以下の詳細な説明を考慮することによって十分に理解できる。この中で、

図1Aは、本発明の円形コンベヤーの底部トレイの平面図を表す。

図1Bは、図1Aで例示される底部トレイの破断面斜視図を表す。破断面は、図1Aで示される軸A-Bに沿っている。

図2Aは、反応チャンバーディスクの平面図を示す。

図2Bは、図2Aの反応チャンバーディスクの破断面側面図を示す。

図2Cおよび2Dは、反応チャンバーディスクの側面壁の拡大図を示す。

図3は、円形コンベヤーの別の底部トレイの平面図を示す。

図4Aは、流体を反応チャンバーの中にまたはその外に送る装置を例示する。

図4Bおよび4Cは、図4Aの装置の操作を例示する。

図5は、3つの反応チャンバーを含めた反応チャンバーディスクを示す。

図6A、6Bおよび6Cは、反応チャンバーを迅速に加熱または冷却する機構を示す。

図7Aおよび7Bは、反応チャンバーを迅速に加熱または冷却する別の機構を示す。

図8Aおよび8Bは、実施例1に使用されるアッセイカセットを表す。

図9は、PCR反応の最初の2サイクルを概略的に図示する。

図10は、反応チャンバーを攪拌する際に有用な磁石の例を示す。

理解しやすくするために、同一の参照番号は、可能な場合に、図面に共通する同一の要素を示すために使用された。

#### 定義

以下の用語は、以下に記載された意味を有する。

- 「アニーリング温度」は、PCR反応に使用されるプライマーおよび標的核酸セグメントの内の1つについての最低の $T_m$ より約5℃低いことを意味する。PCRプロトコルは、プライマーがサンプル核酸に結合（すなわち、とハイブリダイズ）する速度を速めるために複製温度より低いアニーリング温度をしばしば使用する。この温度は、一般に約45℃と約72℃の間、しばしば約55℃である。
- 「DNA鎖分離温度」は、サンプルに存在しうる相補的鎖の核酸を分離するためにPCRプロトコルで使用される温度を意味する。この温度は、一般に約92℃と97℃との間、好ましくは約94℃である。
- 「上昇圧」は、周囲の大気圧より大きな圧力を意味する。
- 「第一のアセンブリー」は、少なくとも1つの反応チャンバー、少なくとも1つの流体交換チャンネル、および少なくとも1つの流体交換ポートを含むアセンブリーを意味する。ここで、第一のアセンブリーは、適切な第三のアセンブリーと流体密閉の接続を形成できる。
- 「流体密閉の」は、空間を満たし、そして90℃～100℃の温度まで1時間加熱された大量の水性液を保持する空間の特性を意味する。2つの材料の間の封印が、その封印がほとんどの透過性材料より実質的にもはや透過できない場合に流体密閉である。
- 「核酸融解温度」または「 $T_m$ 」は、その平衡が、支持される塩基対の複写物から二本鎖の支持される分離に移行する核酸の二本鎖複製についての遷移温度を意味する。
- 「反応カセット」は、第一のアセンブリーおよび第三のアセンブリーを包含する使い捨てできる単位を意味する。



- 「減圧」は、周囲の大気圧より低い圧力を意味する。
- 「複製温度」は、核酸再産制酵素に、プライマーが結合（すなわち、ハイブリダイズ）された核酸の相補的鎖を産生させるPCRに使用される温度を意味する。この温度は、Taqポリメラーゼのような熱安定性ポリメラーゼを使用する場合、一般に約69℃と約78℃の間、好ましくは約72℃である。
- 「第二のアセンブリー」は、熱源または冷却槽またはその両方を含めた温度を制御するアセンブリーを意味する。第二のアセンブリーはまた、「補助ブロック」としてここに示され、そして流体回転翼を包含することもできる。
- 「標的核酸セグメント」は、存在する場合には、PCR反応で複製されることが意図される配列のような核酸のサンプルで同定されるかまたは測定されると思われる核酸のセグメントを意味する。標的セグメントは、一般にサンプルで発見されたより大きな核酸分子の一部である。
- 「実質的に均一温度」は約 $\pm 0.3$ ℃以内で変化する温度である。
- 「第三のアセンブリー」は、1つまたはそれ以上の流体チャンバー、1つまたはそれ以上の流体交換チャンネルおよびポートを包含するアセンブリーを意味し、それは、適切な第一のアセンブリーと流体密閉の組合せを形成する。

#### 詳細な説明

本発明は、反応チャンバー内で流体密閉の手段で生化学的反應を操作するアッセイシステムである。そのアッセイシステムは、その成分部分のいずれの特定の幾何学または配位にも限定されない。好ましくは、そのアッセイシステムには、円形、正方形または長方形のアセンブリー、またはそれらの組合せが含まれ、そのため、反応チャンバー（「第一のアセンブリー」）、熱源または冷却槽または両方、および複数の流体チャンバー（「第三のアセンブリー」）をそれぞれ包含する別々の構成要素は、適切に、滑りまたはトランスロケートすることによって互いに関連して移動できる。第一および第三のアセンブリーは、1つのアセンブリーをもう1つのものに対してその連結したエッジまたは表面にそって滑らせた結果としてアセンブリー間で流体の繋がりを提供するために可逆的に接触できるおのおの流体交換ポートを有する連結エッジまたは表面を有することができる。こ

のようなスライディングは、使用されるアセンブリーの配座によって直線または環状手段で生じる。環状の配座が使用される場合、このようなスライディングは、あるいは回転と見なされる。第一と第二または第一と第三のアセンブリーまたはその両方はおのこの、第一または第三あるいは両方のアセンブリーから接触または分離する第二のアセンブリーをトランスロケーションする結果として、温度制御、または流体または反応チャンバーにまたはから推し進める流体、またはその両方を提供するもう一方に接触して可逆的に設置できる連結表面または表面を有することができる。

環状の実施態様が、添付図面で描かれ、示されている。図1Aおよび1Bでは、円形コンベヤー100の底部トレイ110は、18の流体チャンバー120A-Qを有することが示される。各チャンバー120は、流体交換チャンネルと繋が

りがあるかまたはできる流体交換ポート121を有する。円形コンベヤー100で、そのチャンバーの側面壁122が、円形コンベヤー100の基部111と一緒に成形され、この基部111は、各チャンバー120A-Qの基部123を形成する。各流体交換ポート121A-Qは、円形コンベヤー100によって形成された平滑な内側環状表面140に存在する。底部トレイ110の頂上に適合する円形コンベヤー100の頂部カバー130は例示されない。カバー130は、一般に流体チャンバーを覆い、そして側面壁122の頂上の間の接合部およびカバー130は、一般に流体密閉の封印を形成する。円形コンベヤー100の回転位置を同調させるアッセイシステムを制御する機構で相互作用するように働く位置ノッチ101も例示される。

図2Aおよび2Bは、環状スロットが反応チャンバーディスクを挿入するために提供される場合に、いかなる系幾何学にも適合できる設計である反応チャンバーディスク200の超構造を示す。例えば、図2Aおよび2Bに例示されるディスク200は、円形コンベヤー100と接合して使用できる。あるいは、反応チャンバーディスクは、複数の流体チャンバーを包含し、反応チャンバーディスクを挿入するのに適切な環状スロットを含む長方形アセンブリーと接合して使用

できる。1つまたはそれ以上の反応チャンバーからなるディスク200は、アクセスシステムの第一のアセンブリーの1つの実施態様である。あるいは、第一のアセンブリーは、流体チャンバーからまたはに試薬および使い捨ての廃棄物を提供する第三のアセンブリーのものと、第一のアセンブリーに含まれる流体交換チャンネルを介した繋がりに影響を及ぼすかまたは破壊する能力を供する他のいかなる適切な形状でありうる。

ディスク200として抱埋された第一のアセンブリーは、構造リング210、ベベルエッジ220および反応チャンバーの厚みを定義するスペーサーリング230を包含する。第一の流体交換チャンネル231および第二の流体交換チャンネル232は、ディスク200の反対側に位置する。図2Cでは、リング210の側面壁211は、第一および第二のノッチ212および213を有する。断面で示される第一および第二の固定リング214および215は、それぞれノッチ212および213に挟むことによってリング210内の場所に噛み合う。膜241は、第一の固定リング214および第一のノッチ212の間に適合し、その結果、反応チャンバー250の上部カバー251を作り出す。膜242は、第二

の固定リング215および第二のノッチ213の間に同様に適合して、下部カバー252を形成する。平滑な外側表面216は、円形コンベヤー100の内側リング表面140に対してぴったりと適合し、液体は密閉した封印を形成し、したがってぴったり合った接合部を形成する。「ぴったりと合った接合部」は、流体密閉のものである。図2Dでは、ディスク200は、さらに温度が上昇したチャンバー250からスペーサーリング230およびリング210を挟み込む働きをするガスケット260を含む。

図3は、トレイ110の別の実施態様を例示する。上で同定された特性に加えて、円形コンベヤー100は、第一の開口部126および第二の開口部127を有する導管125を有する。導管は、流体交換チャンネルとしてもここに示される。第二の開口部127は、ガスまたは流体（例示されず）の源との結合を増進するように設計される。流体チャンバー120-H1は、バルブ締めされた橋門124によって円形コンベヤーの外側リムに結合している。

図4 A、4 Bおよび4 Cは、流体をチャンバー250に入れるための上部補助ブロック300 Aおよび下部補助ブロック300 Bを有する機構を例示する。ここで、アッセイシステムは、任意の結合構造を有し、そして構造300は、流体回転翼の実施態様である。上部ブロック300 Aは、上部ガス入口／出口310 A、上部マニホールド（多岐管）320 Aおよび複数の上部加圧チャンネル321 Aを含めた通路でハニカム構造をなしている。上部チャンネル321 Aは、上部膜241の表面に隣接して存在する。対称な下部ブロック300 Bの対応の構造は、「A」の代わりに末尾に添えた「B」を使用して対応して番号づけされる。図4 Bで、ガス圧が、上部ガス入口／出口310 Aおよび下部ガス入口／出口310 Bを通してかけられ、その結果ガスが排出する上部および下部加圧チャンネル321 Aおよび321 Bは、上部および下部膜241および242と一緒にさせ、その結果チャンネル250から流体を通させ、したがって、前述の流体回転翼の実施態様について説明を供する。図4 Cは、ガス入口／出口310 Aおよび310 Bに用いられた真空が、上部および下部チャンネル321 Aおよび321 Bで吸引状態を作り出し、上部および下部膜241および242をそれぞれブロック300 Aおよび300 Bに接着させ、それによって上部および下部膜241および242を引き離し、そして部分的に本発明品を排気する。チャンネル250中の部分的真空は、第一または第二の流体交換チャンネル231または232

の1つを通して本発明品に引き込む助けをする。

図5で、反応チャンバーディスク200は、3つのチャンバー250 A－250 Cを包含し、これは、全ての適切な形状または容量であり、おのおのは第一の流体交換チャンネル231 A－231 Cおよび第二の流体交換チャンネル232 A－232 Cのそれ自身の組を有し得る。

図6 Aは、それが追加の特性を包含することを除き、図4 A－4 Cに例示される補助ブロックに類似する第二のアセンブリーの1つの実施態様を示す。第二のアセンブリー300 Aは、上部導管330 Aでハニカム構造をなす。上部導管330 Aは、上部入口331 Aおよび上部出口332 Aを有する。上部ブロック3

00Aの上部部分301Aは、断熱材から作られる一方で、上部セクション302Aは、熱伝導材から作られる。上部電熱器340Aは、チャンバー250に隣接して位置決めされる。一般に、例示された上部第二のアセンブリー300Aの複製下部第二のアセンブリー300Bは、チャンバー250の底に位置決めされる。

図6Bは、図6Aの上部第二のアセンブリー300Aのための付随支持デバイスの図表を示す。冷却水は、ポンプおよび水冷却器コンソール350から上部および下部導管330Aおよび330Bを通して進められる。ポンプおよび水冷却器コンソール350は、さらにコントローラー400の制御下での流体バルブ操作を包含する。電流は、電力供給360によって上部および下部加熱器340Aおよび340Bに供給され、コントローラー400によって制御される。コントローラー400は、上部および下部熱センサー370Aおよび370Bから入力を受ける。

図6Cは、上部拡張部303Aが上部補助ブロック300Aの外側面に加えたこと以外は、図6Aのものに類似する第二のアセンブリー300Aの別の実施態様を示す。上部拡張部303Aは、一般に上部セクション302Aと同じ材料から作られる。上部部分301Aは、上部セクション302Aと同じ材料から作られるのが好ましい。第一および第二の上部断熱セグメント322Aおよび323Aは、上部部分301Aと上部セクション302Aの間に挟まれる。第一および第二の熱センサー304Aおよび306Aは、上部セクション302Aおよび上部拡張部304Aにそれぞれ位置し、それぞれ第一および第二の上部リード305Aおよび307Aによってコントローラー400に繋がっている。

図7Aでは、上部第二のアセンブリー500Aは、1組の対の第一および第二の上部電熱ブロック511Aおよび512Aを包含する一方で、下部第二のアセンブリー500Bは、1組の対の第一および第二の下部電熱ブロック511Bおよび512Bを有する。第一の上部および下部熱電ブロック511Aおよび511Bは、p型半導体材料から成る一方で、第二の上部および第二の下部熱電ブロック512Aおよび512Bは、n型半導体材料から成る。ブロック511および

び512は、上部および下部コネクタ513Aおよび513Bによって電氣的に直列に繋がられて、熱電的熱ポンプを形成する。上部および下部ガス入口／出口510Aおよび510Bは、それぞれ上部および下部マニホールド520Aおよび520Bに連結し、上部および下部熱電ブロック501Aおよび501Bの間の空間によって形成される。マニホールド520Aおよび520Bは、それぞれ上部の複数の通路521Aまたは下部の複数の通路521Bに連結される。上部および下部ブロック500Aおよび500Bの外側部分は、それぞれ上部および下部加熱槽504Aおよび504Bである。第一の上部空気密封つば506A、第二の上部空気密封つば507A、第一の下部空気密封つば506Bおよび第二の下部空気密封つば507Bは、マニホールド520Aおよび520Bを形成する助けをする。上部および下部熱センサー570Aおよび570Bは、それぞれ上部および下部リード571Aおよび571Bによってコントローラーまたは監視装置に連結可能である。図7Bは、チャンバー250に面しているセラミックス製末端板502の表面を例示する。図7Bは、図7Aに表されない第二のアセンブリ500Aおよび500Bの立体態様の1つを例示する。図7Aに表されない第二のアセンブリの別の属性は、熱電ブロックが一般に例示されるとおり、平面より立体で整列されることである。

図9は、ポリメラーゼ連鎖反応の図式である。ライン901は、右から左に5'から3'への方向性を示す標的DNAの第一の鎖を表す。ライン902は、3'から5'への方向性を示す標的DNAの相補鎖を表す。プライマー903は、Iの位置で第一の鎖901に相補的である。プライマー904は、Jの位置で第二の鎖902に相補的である。DNAを複製するポリメラーゼによって使用される温度安定性DNAポリメラーゼ（例えば、Taqポリメラーゼ）およびヌクレオチド三リン酸は、混合物に存在する。第一段階として、鎖901および902を分離する鎖分離温度まで温度を上昇させる。その後、第二段階で、多くのプラ

イマーが第一および第二の鎖901および902にそれぞれIおよびJの位置で結合し、そしてそのポリメラーゼが結合した第一および第二のプライマー903および904の上に構築して、それぞれ第一の鎖902および第二の鎖901の

部分のレプリカを構築する複製温度まで温度を下げる。2サイクル後、IおよびJの位置の間のDNAの部分は、4倍複製された。

チャンバー250は、全ての適切な形状を有することができる。円形形状として、前述の第三のアセンブリーは、円形コンベヤーの形状すなわち、それぞれ試薬または廃棄産物の円形コンベヤーまたはデポジッターであるのが好ましい。代替的立体配置は、矩形容量であり、ここで第三のアセンブリーは、反応チャンバーを包含する第一のアセンブリー上の流体交換ポートに関して滑らしうる。第三のアセンブリーは、これらに限定されないが、光学グレードのガラス、シリコン基材材料またはプラスチックを含めた多くの材料から構築されることができる。ある場合には、例えばクロロメチルシランまたはジクロロジメチルシランを有する材料を表面処理して、タンパク質や核酸のような生物学的分子に結合する材料上の部位を最小限にすることが必要なことがある。非常に好適な材料は、ポリエチレン(PE)であり、特に高密度グレードPEであり、それは高温に耐性であることが好ましい。プラスチックから構築される場合、第三のアセンブリーは、射出成形によって形成されることが好ましい。

一般に、第三のアセンブリーのカバー130は、底部トレイ110から別々に形成される。カバー130は、例えば、2つの材料が融合するまで熱をかけながらこれらの部材と一緒に加圧し、そしてその後融合結合部が固まるまで、部材と一緒に加圧し続けながら迅速に冷却することによって、トレイ110に付着する。チャンバー120の側面壁122とカバー130の間の封印は一般に流体密閉である。カバー130は、編み込み可能で弾性である変形可能な高分子材料またはガラスのようなより堅固な材料のいずれかから形成される。さらに堅固な材料が使用される場合は、トレイ110を形成する材料のものに比較できる膨張係数を示すのが好ましい。しかし、この熱膨張の類似性は、円形コンベヤーが2つまたはそれ以上の温度の間の循環にかけられたアッセイシステムの部分から除去されるのでこの内容では重要ではない。

カバー130が変形可能な材料から作られる場合、流体をチャンバー120からチャンバー250に流させる流体回転翼は、出来るだけ多くの断面領域がプラ

ンジャーにチャンバー120の壁の範囲内に適合させて、流体交換ポートを通して、そして適切に整列した反応チャンバー内に流体を動かす機構プランジャーでありうる。円形コンベヤー100が回転可能である場合、アッセイ（または他の反応）が、チャンバー120中の流体をチャンバー250に移させるためにアッセイシステムで操作される場合のようなプランジャー下でチャンバー120を位置決めするように回転できる。同様に、矩形系では、第一および第三のアセンブリーは、互いに相対的に滑って、試薬含有の第三のチャンバーを反応チャンバーに連結する流体交換チャンネルを整列させる。この回転および滑りは、反応チャンバーの（円形コンベヤーの実施態様に関して）それぞれ第一または第二流体交換チャンネル231または232のいずれかと繋がった流体交換ポートを有する流体チャンバーと繋がって流体交換ポートを整列するために検査する。ある実施態様では、チャンネル231またはチャンネル232が流体交換ポート121と整列される場合、他のチャンネル（231または232）は、別のポート121と整列される。この二元的整列が流体を1つのポート121を通してディスク200に挿入させる一方で、先にディスク200に存在するガスまたは流体は、他の121を通して押し込まれる。別の実施態様では、ディスク200は、流体の挿入の前に空にされ、それは連続流体挿入を増進する。

流体をチャンバー120からチャンバー250に流す別の手段は、補助ブロック（図4Aの上部補助ブロック300Aなど）を変形可能なカバーを有するチャンバー120を越えて整列することを要する。補助ブロックは、カバー130に対して圧力を作り出して、それを下向きに変形させ、その流体を流体チャンバーの外に移動するために使用される複数のガス通風口を包含する。チャンバー120A-120Qの側面壁122に付着したブロック300Aとカバー130の剛直な部分の間のスペーシングは、その流体に十分な圧力をかけるのに十分に狭いのでその結果その流体はポート121を通してチャンバー120の外に移動する。このタイプの機構は、図4Aに例示される。このタイプの機構は、通気口に吸引をかけることによって逆に操作して、その結果カバー130が補助ブロック表面に付着しようとする。付着したカバー130と一緒に補助ブロックがチャンバー120から引き離され場合、チャンバー内で部分的真空が作り出され、流体を



チャンバーに引き込ませる。

別の実施態様では、流体チャンバーは、円形コンベヤーの外側エッジに連結されたバルブ状橋門124を有する。円形コンベヤー100は、例示された方向に正しい角度で操作でき、その結果液体が空にされるチャンバー120は、チャンバー250の上に整列できる。ガスは、橋門124を通してチャンバー120に導かれて、チャンバー120の底部に位置される交換ポート121を通してチャンバー120中の流体を空にさせる。ガスがチャンバー250に導入されないことを保証する1つの方法は、チャンバー120より少ない容量にチャンバー250を設計することであり、それにより、全ての液体がチャンバー120から排出される前にチャンバー250が満たされる。ヘリウムのように水溶液中で溶解性が低いガスは、一般にこの内容において好ましい。

橋門124のバルブは、流体の受入れを許すがチャンバー120から流体の外向きの流れを遮断する検査バルブでありうる。あるいは、そのバルブは、円形コンベヤーの外側表面に接触して繋げられた電磁的に始動されるバルブでありうる。これらの接点は、バルブを始動する電力を提供する他の電氣的接点と配列できる。

図3は、流体チャンバー120A1、120B1などが、丸い断面形状の複数の種々のサイズのチャンバーを包含する底部トレイ110の代替の実施態様を例示する。カバー130は、チャンバー120A1などと固定して配列されるプランジャーと交換できる。円形コンベヤー100が回転するように設計されれば、プランジャーは、円形コンベヤー100と回転する超構造に固定される。アッセイ流体に接触する全ての構成要素の使い捨て性を増進するために、プランジャーそして超構造さえも、プラスチックのような安価で容易に成形された材料から作製することが好ましい。密封栓の形成を増進する好ましい実施態様で、材料「C」は、プランジャーを構築するのに使用され、そして材料「D」は、流体チャンバーの壁を構築するのに使用される。ここで、材料CおよびDは、アセンブリーが使用の際に変形しないことを保証するR50と等しいかまたはより大きなロックウエル硬度値を示す。ポリエチレンのような水に対する透過性の低い材料を使

用することが同様に重要である。好ましい実施態様で、Cは、R 5 0 ポリエチレンである一方で、Dは、R 1 1 0 ポリカーボネートである。

あるいは、流体は、上述と同じ機構によって、図3のチャンバー120A1などの外に排除されるかまたはその中に引き込まれる。

1つの実施態様では、円形コンベヤー100は、その頂部半分にチャンバー120を、そして底部半分に追加のチャンバー120を有する（例示されない）。

この実施態様では、アッセイシステムは、流体にチャンバー120を離れさせる2つの手段を有することができる：1つは円形コンベヤーの上部部分と配列され、他方は、下部部分と配列される。

アッセイシステムがディスク200のような1つのチャンバー250以上に順応するように設計される場合、第一のアセンブリ当たり少なくとも約9つのチャンバー120であることが好ましく、さらに第一のアセンブリ当たり少なくとも約15（15）のチャンバー120であることが好ましく、さらに第一のアセンブリ当たり少なくとも約20（20）であることが好ましい。

流体チャンバー120に加えて、ある実施態様では、第三のアセンブリを通して1つまたはそれ以上の導管125があり、各導管は、第一または第二の流体交換チャンネル（それぞれ、231または232）と配列する能力がある内部リング表面140に第一の開口部126を有する。導管は、これらに限定されないが、洗浄液または不活性ガスのようなガスまたは流体の源と連結を形成する能力がある第二の開口部127を有する。

典型的に、交換ポート121、導管125および橋門124は、約125マイクロメートル（ $\mu\text{m}$ ）と約1250  $\mu\text{m}$ の間、好ましくは約500  $\mu\text{m}$ の直径を示すチャンネルまたは開口部である。特に、円形コンベヤー100は、約8 cmと約10 cmの間の直径、および約5 ミリメートル（mm）と約8 mmの間の深さを有する。第三のアセンブリの他の配置は、例えば四角い形状について約7 cmと9 cmの間の長さおよび約5 mmと約8 mmの間の深さを有する同様の容量を占める。

第一のアセンブリは、1つまたはそれ以上の反応チャンバーを包含し、そし

て第三のアセンブリーについて規定されるものと同じ材料から構築できる。1つの実施態様では、ディスク200は、図2Aおよび2Bで例示されたとおり、第一および第二の交換チャンネル（それぞれ、231および232）を有する構造リング210から作られる。リング210は、円形コンベヤー100の内側リング表面140の範囲内にぴったりと適合し、その結果アッセイシステムにアセンブリーを流体密閉させる。

1つの実施態様では、チャンバー250は、図2Cおよび2Dで例示されたとおり構造リングをわたる2つの薄い変形可能な膜241および242を広げることによって形成される。好ましくは、膜241および242は、ポリエチレン、

臭化ポリビニリデンまたはポリエチレン／ポリエチレン テトラフタレート二層のような伸縮自在でそして柔軟である変形可能な重合体フィルムから形成される。適切なフィルムが、例えば、ミネソタ州（MN）、ミネアポリス（Minneapolis）のKapak Corporationまたはデラウェア州（DE）、ウイルミントン（Wilmington）のイー・アイ・デュポン・ド・ニューモラス・アンド・シーオー、（E. I. duPont de Nemours and Co.）から入手可能である。好ましくは、膜241および242は、約120℃と同じ高さの温度に耐性である。好ましくは、膜241および242は、厚みで約25と約150  $\mu\text{m}$ の間であり、さらに好ましくは、約50と100  $\mu\text{m}$ の間である。膜の薄さは、反応チャンバーと隣接加熱または冷却装置の間の迅速な熱交換を促進する。好ましくは、各チャンバー250の総量は、約5  $\mu\text{l}$ と約200  $\mu\text{l}$ の間であり、さらに好ましくは、約20  $\mu\text{l}$ と約100  $\mu\text{l}$ の間である。好ましくは、チャンバー250は、約1mmまたはそれ以下の厚み（すなわちカバー251および252の間の距離）を有する。

チャンバー250が変形可能な上部カバー251または下部カバー262（または両方）を有する場合、反応チャンバーに、またはその外に流体を押出すためにチャンバー120について上述と同じ方法でこれらのカバーに力を加えることができる。これを行う好ましい手段は、図4A、4Bおよび4Cに例示される。しかし、上部カバー251およびカバー252の両方が反応チャンバーに、また

はその外に流体を移動するために変形されることを例示が示す一方で、これらのカバーの一つは、剛直であり、そして流体は、伸縮自在なカバーの変形にのみ用いるような反応チャンバーの内に、またはその外に移動できることに注目されたい。

チャンバー250は、流体交換チャンネル231または232が、示されたチャンバー120の流体交換ポート121と配列される場合に、他の流体交換チャンネルが封印（すなわち、流体交換ポートと配列しないで）される。この位置で、流体は、例えば図4Bに例示される機構を用いて、チャンバー250から配列された流体チャンバー120に向けることができる。その後、流体は、別のチャンバー120と交換チャンネル231または232を配列し、そしてチャンバー120中の流体をチャンバー250に押しやることによって、チャンバー250に引き込むことができる。その流体は、円形コンベヤー100に関連した機構を介

してかけられた正の圧力を用いて、あるいは図4Cに例示された機構を通してかけられたもののような負の圧力で、チャンバー250に引き込むことができる。

単一のアッセイシステムに順応できる可変のアッセイを増進するために、反応チャンバーディスク200のような第一のアセンブリーは、1つのチャンバー250より多く、好ましくは少なくとも3つ、さらに好ましくは少なくとも5つを包含するのが好ましい。3つの反応チャンバー250A-Cを有するディスク200は、図5に例示される。各チャンバー250が、それ自身の組のチャンバー120と、反応カセットの別の120°円弧内に位置した1組のチャンバー120の個々と相互作用できるように例示のディスク200が設計されることに注目されたい。好ましい実施態様は、ディスク200のチャンバー250のカバー251または252は、柔軟な膜241および242である。

反応チャンバーに流体を押し込むまたは押し出す機構と連結した多反応チャンバーシステムを使用する場合、上述されるようなことをする機構のいくつかは、当業者に明らかである方法に改変が必要であるかもしれない。しかし、これらの改変をなす手段は、一般に流体が同時に全ての反応チャンバーに挿入または、そこか

ら排除されるので、より容易になされる。この反応チャンバーの同時操作のために、図4A-4Cに例示される反応チャンバーを空にするかまたは充填する圧力制御機構は、おそらく、流体チャンネル321Aおよび321Bを反応チャンバーと通路をよりよく配列する配分に換えるように改変を必要とすべきではない。

第一のアセンブリーは、図5に例示されるような反応チャンバーディスクのような多層の反応チャンバーを含む場合、例えば、第一のチャンバー250Aに使用するのに適切な流体チャンバーは、外側表面216に第一の位置でチャンネル231Aを有する一方で、第二のチャンバー250Bは、外側表面216で第二の位置に流体交換チャンネルを有する。追加のチャンバー250は、別の異なる位置に交換チャンネルを有する。示されたチャンバー250で使用するのに適切な各チャンバー120は、ポート121を対応するチャンバー250のチャンネル231と配列するのに適当な内側表面140上の位置に位置決めされたポート121を有する。

一般に、チャンネル231および232は、約125 $\mu$ mと1250 $\mu$ mの間、好ましくは約500 $\mu$ mの直径を有する。一般に、ディスク200は、約7.5cmと約10cmの間の直径、および円形コンベヤー100の深さにおおよそ対

応する深さを有する。アッセイシステムの他の形状の内容に使用される第一のアセンブリーは、第三のアセンブリーに関して上で同様に論議されたのと同様の容量を占める。

円形コンベヤー100の表面140とディスク200の外側表面216のような、第一および第三のアセンブリーの間の封印の質を決定する際に重要な変数は、これらの2つの表面の間の平滑さ、および適合性である。プラスチックを使用する場合、十分に平滑な表面に達するための1つの方法は、射出成形によって表面を形成することである。オハイオ(OH)、シンシナチー(Cincinnati)のユー. エス. プレシジョン・レンズ(U. S. Precision Lens)またはアールアイ(RI)、プロビデンス(Providence)のマトリックス・インク.(Matrix Inc.)によって記載された射出

方法は、特に小さなアセンブリーの平面再生性に適している。

堅固な封印を形成するのを促進するのに好ましい実施態様としては、材料「E」は、表面140を構築するのに使用され、そして材料「F」は、ディスク200の外側表面216を構築するのに使用される。ここで、材料EおよびFは、先に示されたようなロックウェル硬度値を示す。好ましい実施態様では、Eは、R50ポリエチレンである一方で、EはR110のポリカーボネートである。

それぞれ、円形コンベヤー100またはディスク200のような、第三または第一のアセンブリーは、一般に滑りまたは回転の動力化された機械的手段に付属される。このような滑りまたは回転装置は、工学分野でよく知られている。コントローラー400がアッセイプロトコルの示された部分に適切なような配列を選択する場合、滑りまたは回転の手段は、第一のチャンネル231または第二のチャンネル232を任意の示された流体交換ポート121と再生的に配列するのに十分に厳密であるのが好ましい。例えば、図1Aに例示される円形コンベヤーの実施態様の位置決めノッチ101は、その外側エッジに均一な組の歯車の歯を有する外側リング内に円形コンベヤーを厳密に適合させるのに使用できる。すなわち、歯車は、コントローラー400の方向でステッパー動力操作と相互作用する。

一般に、ディスク200または円形コンベヤー100の内の1つが、回転の電動化手段に付属される場合、もう一方は、アッセイシステムの操作中適切な位置に固定される。この位置への固定は、配列の多様性を減少させ、そして円形コン

ベヤー100およびディスク200の間の配列の再生性を改善する。

第三または第一のアセンブリーの内の1つ、例えば、円形コンベヤーまたは反応チャンバーディスクを回転または滑らせる多くの手段は、機械分野で通常に習熟した者に明らかである。

上部または下部第二のアセンブリー300Aまたは300B（またはもちろん、上部および下部第二のアセンブリー500Aまたは500A（B））は、複数の上部または下部加圧流体チャンネル321Aまたは321Bを含むことができる。これらのチャンネル内の流体は、一般にガスである。大気圧より高いガスは

、例えば上部または下部ガス入口／出口310Aまたは310Bに使用される加圧ガスキャニスターあるいはポンプからチャンネル321Aまたは321Bにかけることができる。例えば、真空ポンプを用いてチャンネル321Aまたは321Bに真空、通常部分的に真空がかけられる。加圧流体チャンネルの圧力を制御する多くの機構は、工学分野で通常に習熟したものに認識される。

隣接反応チャンバー250に真空を作り出す機構の一部として、ブロック300Aまたは300Bは、ブロックAまたはブロックBをチャンバー250から押出す手段を有することができて、その結果反応チャンバーから付着して伸縮自在なカバー251または252を押出す。補助ブロックを押出すような手段は、一般に機械的または電気機械的装置である。このような装置は、工学分野で通常に習熟した者に周知である。

好ましい実施態様では、(1)少なくとも1つの反応チャンバーが、図2Bで構造250、251および252のような一般に上部カバーまたは下部カバーである透過な外側壁（または2つの外部壁が透過である）を有するか、または(2)少なくとも1つの流体チャンバーは、一般にそのチャンバーの頂部カバーまたは底部である透過な外側壁（または2つの外部壁が透過である）を示すかのいずれかである。この実施態様でアッセイシステムは、透過なカバーまたは底部に光を向ける能力のある光源、および(a)照明チャンバーから反射される光（例えば、図8Aまたは8Bでの250または120のような）、(b)照明チャンバーを通して透過する光（250または120）、または(c)チャンバーで励起した分子から放出する光（250または120）を検出する検出装置を包含する。外側壁は、生物学的分子を検出するのに有用な波長で少なくとも約80%透過である場合に「透過」である。

検出装置は、光繊維を取込むことができる。繊維光学素子で、アッセイシステムに隣接する検出システムのサイズは、最小限にされる。このサイズが最小化されて、アッセイシステムに温度制御装置（第二のアセンブリーに組込まれた）および回転機構を一緒に有する検出系の組込みが促進される。特に好ましい光源は、固体状態のレーザーである。これらの光源のサイズは、アッセイカセット付近

に多くの補助アセンブリーを組込むことも促進する。PCRが最近の固形状態のレーザーを組込むアッセイシステムで行われる場合、増幅核酸を検出するのに使用される方法は、下記記載のように、増幅核酸の存在を示すために、約600ナノメートル（nm）より高い波長で光を吸収する染料を使用する。このような染料の例としては、その試薬が600-650 nmで吸収し、そして630-750 nm範囲で蛍光シグナルを発光するCy 5 TM複合体試薬（ペンシルベニア（PA）、ウエスト・グローブ（West Grove）のジャクソン・イムノリサーチ・ラボズ、インク。（Jackson ImmunoResearch Labs, Inc.））、アロフィコシアニンおよびアロフィコシアニン複合体試薬（ミズーリー（MO）、セント・ルイス（St. Louis）のシグマ・ケミカル・シーオー。（Sigma Chemical Co.））、およびC-フィコシアニンおよびC-フィコシアニン複合体試薬（ミズーリー、セント・ルイスのシグマ・ケミカル・シーオー。）が挙げられる。上述された比較的高い波長は、アッセイシステムのオリゴヌクレオチド、プラスチックおよび他の構成要素と関連した多くのバックグラウンドの蛍光を避ける。好ましい固形状態のレーザー源は、レーザー・マックス、インク。（Laser Max, Inc.）のモデルLAS-200-635.5（ニューヨーク（NY）、ローチェスター（Rochester））である。

検出装置からのシグナルは、一般的に、アッセイがアッセイ記録を続けるかまたは発生するかを決定するのにそれらが使用できるコントローラー400に入力される。

チャンバー250の温度が増加または減少される速度は、PCRに基づくアッセイを含めた種々の酵素に基づくアッセイを最適化するのに重要である。PCRに重要な温度サイクルの間、核酸サンプルが酵素的に再生される比較的低い温度で、そして核酸サンプルが核酸の二本鎖を分離するまで融解するより高い温度で操作することが重要である。アッセイ装置が、示された核酸増幅に適切であると

考えられる2つの予備選択された温度の間で繰り返す間に、種々の望ましくない化合物が生じると予測できる。例えば、温度がより低い温度から上昇するとき、



複製酵素は、規定された低い温度に達した複製の適切な精度である必要はないが、機能を継続することが予測できる。より高い温度の設定点で、この望ましくない酵素活性は、高い温度によって阻害される。したがって、2つの操作温度プラトー（安定期）の間の反応温度を迅速に変化させることが重要である。

その温度が反応チャンバー内で迅速に変化できる1つの機構は、図6Aおよび6Bで例示される。この例示は環状形状のアッセイシステムに関して提供されるが、当業者に了解されるような同じ熱源および冷却槽要素が、任意の適切な形状のアッセイシステムの内容で使用できる。チャンバー250が低いプラトー温度「G」で操作されることを確認した。このような条件下では、冷却水は、上部および下部導管330Aまたは330Bを通して流れない。チャンバー250内の温度がG-X（ここで、Xは、温度差である）の温度のすぐ下に低下した場合に、上部および下部加熱器340Aおよび340Bを断続的に操作することによって温度が維持される。予めプログラムされた時間に、温度は、温度が温度Hで温度安定に至る温度に達するまで、加熱器340Aおよび340Bを活性化することによって、高いプラトー温度「H」に上昇される。導管330Aおよび330Bを通る水流は、必要であれば、その作用が第二のアセンブリーの冷却槽の有効性を増す傾向にある温度の行過ぎ量を最小限にするために活用できる。チャンバー250の温度がH-Y（ここで、Yは温度差である）の温度のすぐ下に下がる場合に、加熱器340Aおよび340Bを断続的に操作することによって、温度Hが維持される。温度Gにサイクルを戻すために、コントローラーは、第二のアセンブリーの導管330Aおよび330Bを通して冷却水を流させるために円形コンベヤー350のポンプ351（例示されず）を活用する。別の実施態様では、十分に冷却されているべき反応チャンバーと接触して可逆的に行われる相当な熱交換容量およびその十分な質量を有する適切な材料によって冷却槽効果が供される。

加熱器340Aおよび340Bは、一般に、薄層電気絶縁層によってブロック300Aおよび300Bの熱導体上部および下部セクション302Aおよび302Bから分離される薄層の導体材料である。ブロックは、アッセイシステムの第二のアセンブリーとしてここに引用され、そのアセンブリーは、熱源および冷却

槽を包含する。あるいは、またはそれに加えて、このような第二のアセンブリーは、流体または反応チャンバーで変形可能なカバーを押すかまたは引くための機構を包含する。例えば、基質上に直接析出させることによって絶縁層が形成される。例えば、シリコンニトリドは、ガス層から析出でき、または酸化アルミニウムは、液体担体を用いて析出できる。加熱器340Aおよび340Bを形成する導体層は、例えば真空蒸散（例えば、ニクロム導体層について）によって、または蒸気からの析出（例えば、酸化インジウムスズ導体層）によって析出させることができる。あるいは、予め形成された加熱器シートが、例えばエポキシセメントまたは供給者により推奨される接着剤を用いて、その物質に接合される。適切な加熱器は、エルムウッド・センサーズ・インク。（Elmwood Sensors Inc.）（アールアイ（RI）、パウツケット（Pawtucket）から、またはオメガ・エンジニアリング・インク。（Omega Engineering Inc.）（コネチカット（CT）、スタムフォード（Stamford））から得られる。

ある実施態様では、それぞれ、加熱器340Aおよび340Bとブロック300Aおよび300Bの間の熱接点は、十分で、その結果ブロック300Aまたは300Bの温度は、隣接チャンバー250の温度にほぼ近いと予測できる。したがって、温度監視手段は、ブロック300Aまたは300Bに載せることができる。他の実施態様では、代表的には、予め組み立てられた加熱器が補助ブロックの上に載せられるもの、反応チャンバー温度を測定する他の方法が必要とされる。このような方法の1つは、図6Cに例示され、これは、ブロック300Aの外側向きで上部拡張部303Aを示す。拡張部303Aは、一般に上部セクション302Aと同じ材料から作られる。上部第二の熱センサー306Aは、チャンバー250内の温度のさらに直接の証拠を提供する一方で、上部第一の熱センサー304Aは、診断的温度情報を提供する。

加熱器とチャンバー250の間の熱移送を最小限にするために、チャンバー250のカバー251および252は、このような柔軟なカバーに対して設置された加熱器340Aまたは340Bの表面に適合できる柔軟な材料から構築されるのが好ましい。

ブロック300Aおよび300Bの非導体の上部および下部部分301Aおよび301Bは、これらに限定されないが、ナイロンまたはポリカーボネートのような非導体材料から製造される。ブロック300Aおよび300Bの導体の上部および下部セクション302Aおよび302Bは、これらに限定されないが、アルミニウムまたは銅のような材料から製造される。

図7Aは、上部および下部補助ブロック500Aおよび500B内で代替の加熱器および冷却装置を示す。例示されたブロック500Aおよび500Bは、図4A-4Cのブロック300Aおよび300Bをするのと同じようにチャンバー250を狭めたりまたは拡張するために機能する。511Aおよび512Bのような要素は、接合部で強力な熱電氣的効果を提供するのに適切な材料から作られる。上部第一および第二リード508Aおよび509Aに、そして下部リード508Bおよび509Bに適切な極の電圧をかけることによって加熱が達成される。電圧の極を反転させて、冷却が達成される。これらの加熱および冷却装置の操作で重要な変数は、温度の均一性である。温度の均一性を増すために、上部および下部第一の末端板502Aおよび502Bは、焼結ペリリアのような高温導体性を示す材料から構築されるのが好ましい。他の適当な材料としては、これらに限定されないが、アルミニウムを含有するセラミックスが挙げられる。好ましくは、末端板502Aおよび502Bの熱半導体性は、少なくとも約 $0.2 \text{ W} / \text{cm} \cdot \text{K}$ 、さらに好ましくは少なくとも約 $2 \text{ W} / \text{cm} \cdot \text{K}$ である。上部および下部温度センサー570Aおよび570Bは、限定されないが、熱結合または抵抗センサーでありうる。センサー570Aおよび570Bは、例えば末端板502Aおよび502B上に薄層として析出されうるか、または末端板502Aおよび502Bの穴に埋没された薄い導線の形態であってよい。

直前の先行する段落に記載された装置を含めた加熱および冷却装置を使用して、チャンバー250の温度は、約 $-20^{\circ}\text{C}$ と焼く $00^{\circ}\text{C}$ の間に維持されうる。高温は、ブロック504Aおよび504Bに対して一定な温度傾向を示す付属の加熱器を必要としうる。反応チャンバー内の温度は、約10秒で、より好ましく

は約5秒で、さらに好ましくは約3秒で約25℃から約75℃で変化できる。逆の冷却段階は、好ましくは約10秒、さらに好ましくは約5秒、さらにその上好ましくは約3秒で行われる。好ましくは、冷却または加熱段階の後、反応チャンバー内の温度における変化は、約1℃より少なく、さらに好ましくは約0.5℃より少なく、さらにその上好ましくは約0.1℃より少ない。

1つの好ましい実施態様では、ディスク200が1つ以上の反応チャンバー2

50を包含する場合、このようなチャンバー250の各々は、反応チャンバーの側に配列される能力のある熱電ブロック501（すぐ上の段落に記載された加熱および冷却装置のような）から造られた少なくとも1つの加熱および冷却装置を有する。さらに好ましくは、各チャンバー250は、2つの対峙する側の各々に加熱および冷却装置を有する。別の好ましい実施態様では、末端板502Aまたは502Bの断面領域が、それに熱が移ることが意図される実質的にチャンバー250の最大の断面領域と一致する。

ブロック500Aおよび500Bで加熱または冷却されたチャンバー250についての温度サイクルの原理は、図6A、6Bおよび6Cのブロック300Aおよび300Bについて上で概略されたものと同じである。

別の実施態様では、反応チャンバーは、加熱または冷却流体、好ましくはガスに、直接1つまたはそれ以上の表面を越えて、または反応チャンバーの1つまたはそれ以上の表面に隣接して位置決めできる熱交換装置を通して通過させることによって、加熱および冷却される。図6Aおよび6Bで例示される装置は、（a）加熱器340Aおよび340Bを取除く（または使用しない）こと、および（b）流体を加熱するための加熱器を加えることによって、この実施態様に従って操作を改変できる。システムは、反応チャンバーに与えられた温度を維持するために適切なように、チャンバー250に導くチュービングに熱いまたは冷たい流体を射出するのに必要とされる評価と一緒に1つにはより熱い流体およびもう1つにはより冷たい流体の2つの流体管理システムを有するのが好ましい。特に、加熱および冷却流体がガスである場合、反応チャンバーによって通過したすぐ後にガスの温度は、反応チャンバーの温度の有用な指標を提供する。

チャンバー250で行われる反応の均一性は、回転磁界によって曝気された磁気ビーズで増加できる。このような磁気ビーズは、抱合生物分子を欠くビーズについてはバング・ラボラトリーズ (Bang Laboratories) (インディアナ (IN)、カルメル (Carmel))、種々の抗体 (例えば、CD2細胞表面レセプターに結合する抗体) に抱合されたビーズについてはダイナル (Dyna1) (ニューヨーク (NY)、レイク・サクセス (Lake Success))、およびガラスマトリックスおよび種々の表面結合生物を有するビーズについてはCPG (ニュージャージー (NJ)、リンカーン・パーク (Lincoln Park)) を含めた数種の源から入手可能である。ビーズが反応

チャンバー内でまたはその外で洗浄されることが予測される使用については、各ビーズは好ましくは約 $25\mu\text{m}$ より小さな、さらに好ましくは約 $12.5\mu\text{m}$ より小さな直径を有し、この直径は、それにより材料がチャンバー250から挿入されるかまたは排除されるそのチャンネルを通して出入りを促進する。ビーズがチャンバー250に残ることが予測される用途では、1つの実施態様では、直径は、これらのチャンネルにビーズが入るのを妨げるのに十分に大きいことが好ましい。チャンバー250内のこのようなチャンネルの入口は、チャンネルが、チャンネルの入口に留まるビーズによって遮断される機会を最小限にするために位置決めまたは設計されるのが好ましい。別の実施態様では、ビーズは、磁界を用いて正しい場所に固定される。

ビーズの中の十分な動きを発生させるために、使用される磁気は、好ましくはチャンバー250内で十分な磁界勾配を発生させることが規定される。このような磁気は、ネオジニウム-鉄-ボロンクラスの天然磁石のような希土類から形成されるもののような高度に磁化された永久磁石で鋭敏なエッジを形成することによって構築できる。このような永久磁石は、例えばエドモンド・サイエンティフィック (Edmund Scientific) (ニュージャージー (NJ)、バーリントン (Barrington)) から入手可能である。特定の反応チャンバーに適切な寸法の鋭敏なエッジは、例えば磁気材料の研磨材研磨によって形成される。このような成形磁気600の例は、図10に示される。ここで、磁石

のN極は屋根型を示す。磁気ビーズに作用する磁界勾配を最大にするために、磁石600の頂部601は、反応チャンバーまたはビーズが位置づけられた他の構造に隣接して設置される。ビーズは、そのNからS軸付近で磁石600を回転させることによって攪拌される。磁気ビーズは、頂部601をそのビーズに隣接させることによって正しい場所に保持される。磁石をそのビーズに隣接したその頂部601で滑らすことによって、ビーズは磁石で移動される。

上述される鋭敏に角付けされた磁石は、1つの場所に磁気ビーズを接着するのに、そして1つの位置から別の位置に、例えば毛管または反応チャンバーに位置づけられたビーズを移動させるのに効果的である。したがって、例えばチャンバー250またはチャンバー120内の流体がそのチャンバーから取除かれるが、ビーズがチャンバー内に残されることが望める場合に、このような磁石は、1つの位置に磁気ビーズを残す助けができる。

種々の細胞結合ビーズ（例えば、特定のサブセットの細胞に特異的な結合抗体を有するビーズ）は、一群の細胞から選択された細胞を接着するのに使用できる。ビーズが磁性である一方で、非接着細胞および流体が洗い流される場合、ビーズは、磁氣的に正しい場所に固定できる。したがって、細胞結合ビーズは、小さな副個体群の細胞を濃縮するのに使用できる。

P C R 反応では、混合は、増幅反応より前の調製段階で重要でありうる。しかし、連続温度サイクルの間、機械的混合は省かれる。したがって、ある実施態様では、ビーズの混合運動を誘導する回転可能な磁石は、種々の試薬が導入された直後にチャンバー250に隣接して配置されうる。その後、試薬は、混合でき、そして磁石は、加熱および冷却装置のような、チャンバー250に隣接する他の機構の配置を増進するために引き揚げられる。

コントローラー400は、一般にマイクロプロセッサである。しかし、タイマー、スイッチ、ソレノイドなどから構成されるより簡便な装置であってもよい。コントローラー400の重要な特性は、それが円形コンベヤー100またはディスク200の動き、流体を押し除ける手段の活性化、および予め設定またはプログラム可能な予定による加熱および冷却装置を指示し、それで以下に概略され

るプロトコールの内の1つのようなアッセイプロトコールを操作させる。好ましくは、コントローラーは、アッセイカセットの反応チャンバーの温度を示す入力を受信し、そしてその入力に応答して制御信号を調整する能力がある。

PCR反応で重要な価値のあるのは、しばしば、アッセイされるべきサンプルに存在する細胞化合物を含めた細胞破片を干渉する量である。概念的には、高度に精製された核酸のみがPCR増幅にかけられるサンプルとして使用される。しかし、このような精製は、診断アッセイで入手できる少量の組織または流体には実質的でない。さらに、核酸の環境的源による汚染に対してアッセイが感受性を示すので、核酸精製段階は、偽りの陽性結果を得る公算を増しうる。診断または法医学のPCRのある領域では、細胞破片による干渉についてのこの考え方は、PCR反応条件の特徴付けについての改善によりいくぶん緩和されてきた。それで、よりいっそう粗成の核酸サンプルが逆効果（副作用）なしに使用できる。ロルフス（Rolf s）らのPCR：Clinical Diagnostics and Research、スプリングー・ラボ（Springer Lab）、1992年（特に第4章など）参照。さらに、ジーンリリーサー（Gene Re

leaser）TM（テネシー（TN）、ミユルフリースボル（Murphreesboro）のバイオ・ベンチャーズ、インク。（BioVentures, Inc.））、パール・リユーコソルブ（Pall Leukosorb）TMメディア（ニューヨーク（NY）、イースト・ヒルズ（East Hills）のポール（Pall））およびダインビーズ（Dynabeads）TMDNAダイレクト（Direct）TM（ニューヨーク、レイク・サクセスのダイナル（Dynal））のような市販品で入手できる文献も参照。PCR手段では、一般にアウスベル（Ausubel）らのカレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー（Current Protocols in Molecular Biology）、ジョン・ウイリー・アンド・サンズ（John Wiley & Sons）、ニューヨーク（アルスベルI）およびピーシーアール：ア・プラクティカル・アプローチ（PCR：A Practical

Approach)、アイアールエル・プレス (I R L Press)、1991年(アウスベル I I) 参照。それにもかかわらず、サンプルに存在しうる細胞の細胞膜と結合した少なくとも細胞破片を除去する能力を有することが望まれる。アッセイシステムと連結して使用するような技術は、以下に記載される。必要とされるレベルの感受性または精度に達するのに必要とされる場合に、このような洗浄段階は用いられ、必要とされない場合に、省かれる。

P C Rを行う場合に、平行制御P C R反応を行うことも重要である。制御の1つの重要なタイプは、反応から得られるサンプルを除くか、または陰性と先に特徴づけられたサンプルを使用する。別の重要なタイプの制御は、P C R反応が増幅のために設計された配列または配列群を含むことが分かっている既知量の精製核酸を導入する。これらのタイプの制御は、複数アッセイシステム単位またはカセットまたはさらに好ましくはディスク200のように同じ第一のアセンブリーの別の反応チャンバーで達成できる。

P C Rで使用する別の制御技術は、P C R反応を設計して、その結果それが多数の核酸セグメント、疾病または遺伝的環境の各指標を増幅することである。個別のセグメントは、多段の反応でまたは同じ反応チャンバーで増幅できる。同じチャンバーで増幅される場合、磁界での実験は、種々のプライマーの間の結合競争が、各増幅サイクルで、複製温度で過ごして、時間を延長することを必要とすることを示した。

細胞破片をサンプルから除去する1つの道具は、最初、細胞に見られる細胞表層分子に特異的な抗体をそこに密着させたビーズにサンプル中の細胞を結合することを含む。白血球細胞またはイー・コリ (E. coli) 細菌 (0157 E株のような) で見られるC D 2分子に結合するビーズは、ダイナル (ニューヨーク、レイク・サクセス) から入手可能である。哺乳類細胞、細菌細胞、ウイルスおよび寄生体で見られた細胞表層分子の絶えず成長するファミリーが特性づけられ、そしてこれらの分子の大半に対して抗体が発生される。たとえば、アドヘッション・モレキュلز (Adhesion Molecules)、シー・ディー・ウエグナー (C. D. Wegner) 編、アカデミック・プレス (Academ



ic Press)、ニューヨーク、1994年参照。これらの抗体の多くは、他のタイプの細胞アフィニティービーズ(例えば、ミズーリー、セント・ルイスのシグマ・ケミカル・シーオー。)を製造する際に使用するために入手できる。細胞は、ビーズに付着し、そして溶解してそれらの核酸内容物を放出できる。放出された核酸と一緒に溶解液は、さらに加工し、ビーズおよびそれらの付着細胞破片を後に残させるために別の容器に移すことができる。

サンプル細胞から核酸を放出するのに使用される溶解液もPCR反応で干渉できる。したがって、いくつかのプロトコールでは、物質に核酸を結合し、その結果その溶解液を洗い流せることが重要である。このような支持体の1つは、イオンまたは他の相互作用の力によって、DNAに結合するガラスビーズのような、DNAに結合したビーズによって提供される。化学的に処理されて、相互作用の部位の数を最大限にする表面を有する適切なビーズは、例えばバイオラッド(BioRad)(カリフォルニア(CA)、ハークルズ(Hercules))から入手可能である。ニトロセルロースまたはナイロン被覆表面のような多くのDNA結合表面を有する磁気ビーズは、本発明を操作する際に有用であると予測される。いくつかの実施態様で、ビーズは磁性であり、磁力を用いて操作できることが望ましい。磁気ガラスビーズは、ダイナル(ニューヨーク、レイク・サクセス)またはシーピージー(ニュージャージー、リンカーン・パーク)によって製造される。いったん核酸がビーズに結合されると、溶解液はビーズから洗いながせる。核酸は、ビーズの存在と共に増幅できる。

サンプルの細胞から核酸を放出するのに使用される溶解液としては、一般に洗剤、好ましくは非イオン性、および緩衝液、通常PCR増幅反応に使用される緩

衝液が挙げられる。溶解液のpHは、約pH8から約pH8.5が好ましい。適切な洗剤としては、これらに限定されないが、サルコシル(Sarkosyl)およびノニデット(Nonidet) P-40が挙げられる。他のアセンブリとしては、MgCl<sub>2</sub>、キレート剤およびプロテナーゼKのようなプロテアーゼが挙げられる。プロテナーゼKは、例えば約100℃に約10分間加熱することによって不活性化されうる。溶解緩衝液の組成によって、増幅アッセイを行う

前に、核酸から溶解緩衝液を洗い流すことが多かれすくなかれ重要でありうる。

増幅反応を支持するのに使用される増幅用緩衝液としては、一般に、4つのデオキシヌクレオチドトリホスフェート類 (NTPs) (例えば、各々約0.2 mMからの濃度で)、緩衝液 (例えば、トリス-HCl 10 mM)、塩化カリウム (例えば、50 mM) および塩化マグネシウム (例えば、1~10 mM、通常指示されたPCRアッセイ略図に最適化されたもの) が挙げられる。pHは、一般に約pH 8.4である。ゼラチン (例えば、0.1 mg/ml) のような他の成分を加えることができる。個々のプライマーは、一般に約0.5  $\mu$ Mの濃度での反応に存在する。必要とされるサンプル核酸の量は、核酸のタイプおよび核酸サンプル中の標的核酸セグメントの数によって変化する。ゲノムDNAについては、サンプル中の各細胞が標的核酸の約2つのコピーを有する場合、約10  $\mu$ g/mlの濃度が望ましい。

簡便性のため、本手段に使用されるポリメラーゼは、Taqポリメラーゼ、組換えTaqポリメラーゼ、Tfl DNAポリメラーゼおよびTli DNAポリメラーゼ (全てウイスコンシン (WI)、マディソン (Madison) のプロメガ・コープ (Promega Corp.) から) のような耐熱性DNAポリメラーゼである。熱安定性であると、PCR反応は、反応容器がDNA鎖分離温度にされる時に不可逆的に変性されたポリメラーゼを置換する反応工程のコースの間じゅう追加のポリメラーゼを加える必要なしにサイクルからサイクルへ進む。好ましくは、使用されるDNAポリメラーゼは、例えばTli DNAポリメラーゼの校正能力のような校正3'から5'エキソヌクレアーゼ活性の存在に関連して精度が上がる。

血液は、診断または遺伝子PCR試験のためのより都合のよいサンプルの1つを提供する。ほとんどの遺伝子試験について、約10から約50  $\mu$ lの血液は、特定の標的セグメントのPCR増幅を行うのに十分なサンプルDNAを提供する

のに十分である。しかし、胎児細胞の分析については、約400の胎児細胞と同じくらい少なく含みうる約20 mlと同じ量が必要とされる。このような多量のサンプル容量は、例えば上述の方法を用いた濃縮を必要とする。微生物疾病につ

いての試験では、サンプル中の標的核酸の濃度は、極めて低い（例えば、細菌ゲノム当たり約2 fgから約5 fg未満）。したがって、このような微生物について試験するアッセイシステムを使用する場合、濃縮法は再度必要とされうる。

特異的にRNAを増幅するために、最初に、逆転写酵素（ウイスコンシン、マディソンのプロメガ・コープ、から入手可能なAMV逆転写酵素のような）を用いてサンプル中のRNAからcDNAを合成する必要がある。RNAサンプルからPCR反応を行う方法は、例えばアウスベルIおよびアウスベルIIに記載される。この目的のためにRNAを製造するために、促進手段は、洗剤（0.5%ノニデットP-40のような）、緩衝液（例えば、pH8.3）および適切な塩類を含有する溶解緩衝液を使用する。それは、使用直前に1:10エタノール中のジエチルピロカルボネート溶液で1:1000に混合される。サンプル細胞がこの溶液で溶解された後、RNAを含む上清が遠心分離より核のペレットから分離される。一般に連続PCRサイクル反応で使用されるプライマーの1つと同じであるプライマーが、例えば65℃に加熱し、続いて一般に約37℃に温度を下げることによってRNAにアニールされる。その後、逆転写酵素、ヌクレオチドトリホスフェートおよび適切な緩衝液を加えてcDNA合成を開始させる。一般に、少量のcDNA合成溶液が、PCR増幅に必要な緩衝液、DNAポリメラーゼ、ヌクレオチドトリホスフェートおよびプライマーを含む溶液に加えられる。その後、温度サイクルのプログラムが開始する。

これらの利点は、実質的にハイブリダイゼーション手順を行うのに用いる。上昇した温度を調節するアッセイシステムのバルブの能力は、この系をハイブリダイゼーションプロトコールに使用させる。ハイブリダイゼーション反応がPCR反応ほど汚染に敏感でない一方で、これらの反応は汚染に敏感であり、その危険性は、使い捨て系で実質的に減少される。

ハイブリダイゼーションを行う手順は、当業界で周知である。例えば、アウスベルIおよびサムブルック（Sambrook）らのモレキュラー・クローニング：ア・ラボラトリー・マニュアル（A Laboratory Manual）、2版、コールド・スプリング・ハーバー・プレス（Cold Spring H

arbor Press)、1989年参照。これらの手順で、標的配列を含む核酸のサンプル源または(b)プローブ核酸の内の1つは、固形支持体に結合され、そしてこの結合の後、残りの結合部位は、不活性化される。その後、それに検出可能なレポーター分子を結合した他の種の核酸は、適切なハイブリダイゼーション条件下で添加される。洗浄後、固形支持体上でその核酸に結合(すなわち、ハイブリダズ)されたレポーター分子の量が測定される。

例えば、ハイブリダイゼーションは、アッセイシステムの反応チャンバーで行うことができる。ここで、反応チャンバーは、RNAがそれに結合された(例えば、電気泳動または分離ゲルからの毛管ブロッティングによって、さらに焼成によって)一片のニトロセルロース膜(または核酸を結合した別の膜)を含む。その後、ノーザン・プレハイブリダイゼーション溶液は、流体チャンバーの1つから反応チャンバーに導入できる。(アウスベルIのノーザンプレハイブリダイゼーション溶液(p. A 1-40)、ノーザンハイブリダイゼーション溶液(p. A 1-39)、SSC(p. A 1-53、20Xレシピ)およびデンハート溶液(p. A 1-14、100Xレシピ)についての処方は、参照によってここに組込まれ、より十分にこのアッセイシステムで行うことのできるハイブリダイゼーション法を例示する。このDNAは、非特異的ハイブリダイゼーションを低減する拮抗剤として働くこれらの処方の2つの再引用されるサーモンの精子DNAは、一般に使用前に分配されることに注目すること。)標的配列とプローブ配列の間の相互作用の溶融温度により、膜およびプレハイブリダイゼーション液は、一夜、約37℃および約42℃の間の温度でインキュベートされる。これらのインキュベーション温度は、一般にプレハイブリダイゼーションおよびハイブリダイゼーション溶液中の50%ホルムアミドの存在が適切に示された範囲内にあることに注目すること。ホルムアミドなしで行われるハイブリダイゼーションでは、インキュベーション温度は、約55℃または約70℃のように一般により高い。その後、膜は、溶融プローブを含有するノーザンハイブリダイゼーション溶液に曝露され、そして一夜、プレハイブリダイゼーションで用いたのと同じ温度でインキュベートされる。ハイブリダイゼーション後、ハイブリダイゼーション溶液を反応チャンバーの外に押出し、反応チャンバーを約25℃にし、そして第一の

洗浄溶液（ $1\times\text{SSC}$ 、 $0.1\% \text{ w/v}$  硫酸ドデシルナトリウム）が導入される。15分後、洗浄が繰返される。さらに15分の洗浄後、第三および最終洗浄が、0.

$25\times\text{SSC}$ 、 $0.1\% \text{ w/v}$  硫酸ドデシルナトリウムを用いて行われる。

このハイブリダイゼーション法は、例示にすぎない。多くの他のハイブリダイゼーション法が、アウスベル I の以下のセクションで記載されるものを含めたアッセイシステムで行える。それらは、参考によってここに組込まれる：ユニット 2. 9、2-24 から 2-30 頁、およびそこに引用されたアペンデックス 1 の処方；ユニット 6. 3、6-6 から 6-7 頁、およびそこに引用されたアペンデックス 1 の処方；およびユニット 13. 12、13-14 頁、およびそこに引用されたアペンデックス 1 の処方。

ハイブリダイゼーション反応に必要とされる温度の上昇は、自動化装置で取り扱われる。例えば、ハイブリダイゼーションは、溶融温度（ $T_m$ ）によっておよそ定義される温度で行うことができる。ハイブリダイゼーションプローブについての  $T_m$  値は、ミネソタ（MN）、プリマス（Plymouth）のナショナル・バイオサイエンス（National Biosciences）からオリゴ（Oligo） $TM v 4.0$  のような市販のソフトウェアを用いて計算できる。

当業界で従来から知られる免疫アッセイ手順で、抗体-抗原結合反応は、一般に室温で、または約  $4^\circ\text{C}$  のような減退した温度で行われる。結合反応後、酵素アルカリ性ホスファターゼによって指向されるような酵素反応によって陽性の結果が一般に示される。この酵素反応は、一般に約  $20^\circ\text{C}$  と約  $40^\circ\text{C}$  の間の温度で行われる。そのアッセイは、約  $0^\circ\text{C}$  と約  $40^\circ\text{C}$  の間の温度範囲で、これらのアッセイを、早くてそして信頼できる温度制御をさせる系で自動化させる。

特に、現代の抗体-基本スクリーニング手順は、「抗原」（適切な形態で適切な動物に注射される場合に、抗原に特異的な抗体を製造させる単に物質である）または抗体が付着した固形支持体を使用する。あるいは、抗原は、細菌または原核細胞のような細胞および固形支持体についての細胞置換体の表面に見られる。

1つのアッセイ（間接ELISA）で、抗原は、支持体に結合され、そして抗原に特異的な第一の抗体を将来的に含み、そして第一の動物種によって産生されるサンプルを結合抗原とインキュベートする。適切な洗浄段階の後、その抗体が第一の種の抗体に特異的であり、そして検出可能な部分（アルカリ性ホスファターゼのような）に付着した第二の動物種から得られる第二の抗体は、支持体とインキュベートされる。サンプルが第一の抗体を含む場合には、第二の抗体は、結合し、検出可能な部分を用いて検出できる。例えば、検出可能な部分が、アルカリ性ホスファターゼである場合、検出は、化合物リン酸p-ニトロフェニルを添加することによって行われ、それは、ホスファターゼ酵素の作用によって青色の物質に変換される。このアッセイは、例えばAIDSウイルスに対する抗体の存在について血液を試験するのに使用できる。

結合抗原を伴う支持体を使用する別のアッセイ（直接拮抗ELISA）で、抗原を将来的に含むサンプルが、その抗体が付属した検出可能な部分を有する抗原に特異的な抗体の限られた量を一緒にともなう支持体とインキュベートされる。溶液相抗原および支持体結合抗原の間の競合のため、サンプル中抗原が多ければ、抗体結合抗原に結合した抗原はより少なくなり、検出可能な部分によって産生されるシグナルはより弱くなる。

別のアッセイ（抗体-サンドイッチELISA）は、抗原に特異的な第一の抗体を使用し、その抗体は支持体に結合される。抗原を将来的に含むサンプルは、その後支持体とインキュベートされる。この後、抗原の第二の部分に結合し、そして付着した検出可能な部分を有する第二の抗体は、支持体とインキュベートされる。サンプルが抗原を含有する場合、抗原は、支持体に結合し、そしてその後検出可能な第二の抗体に結合する。これは、抗原が妊娠関連のホルモンである絨毛性性腺刺激ホルモンである家庭用妊娠試験についての基礎である。

結合抗体を有する支持体を使用する別のアッセイ（二重抗体サンドイッチELISA）では、第一の種から生じる第一の抗体を将来的に含むサンプルを、それに第一の種の抗原に対して特異的である第二の種から生じる第二の抗体に結合した支持体とインキュベートする。その後、第一の抗体に対する抗原は、担体とイ

ンキュベートされる。最終的に、第一の抗体に結合されない抗原の一部に特異的な第三の抗体は、支持体とインキュベートされる。第三の抗体は、付着した検出可能な部分を有する。サンプルは第一の抗体を含む場合、検出可能な第三の抗体は、支持体に結合する。

これらのそしてその他の免疫アッセイは、アウスベルエのユニット11.1および11.2、11-1から11-17頁、そのテキストおよびそこに引用されたアペンデックス1の処方に記載され、参照によってここに組込まれる。

以下の実施例は、さらに本発明を例示するが、もちろんその範囲を限定するいかなる方法にも意図されない。

#### 実施例1－熱源／冷却槽操作

アッセイシステムの例示円形立体配置に関して使用され、図6Aに描写された加熱装置および冷却装置の操作は、熱流量式に対して有限元素近似を用いた熱輸送シミュレーション・コンピュータープログラムを用いて模擬実験が行われた。以下の前提で模擬試験が行われた：チャンバー250の厚みは0.5mm、上部および下部カバーは、0.1mm厚であり、加熱器および補助ブロックの間の絶縁部は、0.025mm厚であった。シミュレーションでは適切な市販の材料で25℃から75℃のジャンプは、3.2秒以内に達成でき、ここで3.2秒後に、反応チャンバー内の温度は実質的に均一である。逆の冷却段階は、約3秒以内に達成できて、反応チャンバー内の温度は実質的に均一で有ることが決定された。

#### 実施例2－PCR反応

PCRアッセイは、図8Aおよび8Bに例示される反応カセットを用いて行われる。ここで、反応チャンバーディスクは、最初に同量の第三の反応チャンバー250A-250Cおよび第一と第三の反応チャンバー（250Aおよび250C）の混合量より8%多い量の第四の反応チャンバー250Dを通った。円形コンベヤーは、17の流体チャンバー120A2から120R2を有する。反応カセットは、サンプルをチャンバー250Dに導入するのに使用される毛細管構造150を有する。毛細管構造は、それを通してサンプルが毛管系に導入される入

口151を有する。アッセイシステムは、上部および下部補助ブロックを有し、その下部は、反応チャンバーディスクから十分に排除されて、回転できる磁石を反応チャンバーディスクの下に位置決めさせることができる。アッセイシステムは、第一の流体を流体チャンバー（120A2から120R2）から反応チャンバー（250Aから250D）に移動させる第一の流体回転翼および反応チャンバー250A-250Dを空にする第二の流体回転翼を有し、そのような両方の回転翼は、上部補助ブロックに見られる。以下に概略される段階1から12は、反応チャンバーから排除された下部補助ブロックで、そしてそのディスクの下に位置決めされた回転可能な磁石で行われる。反応プロトコールは、以下のとおりである：

1. 毛細管構造150は、アッセイカセットのチャンバー250Dと一列に配列され、毛細管150中の血液サンプルは、空気圧を用いてチャンバー250Dに押込まれる。（毛細管は、毛細管構造の出口を、反応チャンバーディスク上の流

体交換チャンネル231Dに隣接して位置決めされた通風口（示されず）と一列に配列し、そして入口151を通して毛管現象により毛細管構造を満たすことによって、血液で満たされている。）チャンバー250Dは、 $50-100\mu\text{m}$ （ニューヨーク、レイク・サクセスのダイナル）の直径を示す磁性の白血球細胞結合のビーズの供給により予め負荷がかけられる。チャンバー250Dは、 $2-4^{\circ}\text{C}$ の温度に維持される。磁石は、回転されてビーズを曝気し、それにより攪拌が提供される。

2. ビーズおよび血液の45分間共インキュベーション後、カセットの円形コンベヤーは、第一のチャンバー120A2が流体交換チャンネル231Dと一列に配列されるまで回転される。未結合細胞に加えて、サンプルから過剰の流体がチャンバー120A2に押出される。ビーズは、チャンバー250Dを放すのを磁氣的に抑制される。

3. この時点で、円形コンベヤーを回転して、増幅緩衝液（ $40\text{mM NaCl}$ 、 $20\text{mM}$  トリス-HCl、 $\text{pH}8.3$ 、 $5\text{mM MgSO}_4$ ）から構成される洗浄溶液を含有するチャンバー250Dを第二の流体チャンバー120B2に



一列に配列させる。洗浄溶液はチャンバー 250 D に押込まれる。

4. 円形コンベヤーを回転して、チャンバー 250 D をチャンバー 120 A 2 と一列に配列させ、その中に洗浄溶液が押込まれ、再度チャンバー 250 D に磁氣的に制御されたビーズを放出させる。

5. 円形コンベヤーを回転して、チャンバー 250 D を第三の流体チャンバー 120 C 2 と一列に配列させ、それから溶解溶液 (0.5 % v/w ツイーン 20 (ミズーリー、セント・ルイスのシグマ・ケミカル・シーオー、) で補足された増幅緩衝液および  $100 \mu\text{g}/\text{ml}$  プロテナーゼ K) が押出される。正しい位置に溶解溶液を固定するために、円形コンベヤーを回転して、流体交換チャンネル 231 D を閉じる。第四の 250 D の温度は、現在  $56^{\circ}\text{C}$  に維持されている。隣接の磁石を回転させて、細胞結合ビーズを曝気することによって攪拌が達成される。

6. 45 分後、円形コンベヤーを回転させて、チャンバー 250 D を第四の流体チャンバー 120 D 2 に曝気させ、それにサンプルの細胞から抽出される核酸を含有する溶解溶液が押出される。再度、細胞結合ビーズは、チャンバー 250 D に残る。溶解溶液の量は、第一および第三の反応チャンバー 250 A および 25

0 C の混合量より 8 % 多い (核酸結合ビーズによって占められた量を除いて)。

7. チャンバー 250 A および 250 C は、磁性で核酸結合ビーズで予め負荷をかけ、そして流体を排除される。円形コンベヤーを、連続して回転させ、第四の流体チャンバー 120 D 2 を流体交換チャンネル 231 A と、そしてその後流体交換チャンネル 232 C と一列に配列し、そしてチャンバー 250 A と 250 C を、第四のチャンバー 120 D 2 から得られた核酸含有溶解溶液で満たす。チャンバー 250 C 中のビーズに、精製 DNA で予め負荷を加え、陽性結果を生じるのに十分な量で増幅配列を含む。チャンバー 250 A は、実験的増幅のためのものである。チャンバー 250 C は、陽性対照を提供する。チャンバー 250 B は、核酸結合ビーズおよび予め負荷を加えられた量の溶解溶液のみを含有する。それは、陰性対照として働く。

8. 円形コンベヤーを、現在回転させて、チャンバー 250 A - 250 C を閉じ

る。チャンバー250A-250Cは、ビーズ上の結合材料と一致する温度に維持される。例えば、ダイナルのダイナビーズM-450パンT(CDL) 結合ビーズについては、最適温度は、2-4℃である。

9. 溶解溶液中のDNAを、DNA結合ビーズに結合させるのに十分な時間である15分後、円形コンベヤーを回転させて、チャンバー250A-250Cを5番目(120E2)、10番目(120J2)および15番目(120P2)の流体チャンバーとそれぞれ一列に配列させ、そして溶解緩衝液は、チャンバー250A-250Cの外に押出される。DNA結合ビーズは、排出するのを磁氣的に抑制される。

10. 円形コンベヤーを回転させて、チャンバー250A-250Cを6番目(120F2)、11番目(120K2)および16番目(120Q2)の流体チャンバーとそれぞれ一列に配列させ、そして洗浄溶液(上述の)は、チャンバー250A-250Cに導入される。DNA結合ビーズは、磁氣的に曝気される。

11. 10分後、円形コンベヤーを回転させて、チャンバー250A-250Cを5番目(120E2)、10番目(120J2)および15番目(120P2)の流体チャンバーとそれぞれ一列に配列させ、そして洗浄溶液(上述の)は、反応チャンバーから押出される。

12. 円形コンベヤーを回転させて、チャンバー250A-250Cを7番目(120G2)、12番目(120L2)および17番目(120R2)の流体

チャンバーとそれぞれ一列に配列させ、それから増幅緩衝液(0.01%w/vゼラチン、0.1%v/wトリトンX-100(ミズーリー、セント・ルイスのシグマ・ケミカル・シーオー。)で補足された)、必要とされるヌクレオチドトリホスフェート、標的配列(0.5μM)を増幅するのに適切なプライマーおよびTaqポリメラーゼ(ウイスコンシン、マディソンのプロメガ・コープ。)を含有する増幅溶液を押込む。

13. 円形コンベヤーを回転させて、チャンバー250A-250Cを閉じる、そして下部補助ブロックは、反応チャンバーディスクの下に位置づけられて、さらに厳密な温度制御を提供する。その後、コントローラーは、ウー(Wu)らの

プロク．ナトル．アカデ．サイ．ユーエスエイ（P r o c． N a t l． A c a d． S c i． U S A）、86、2752-2760（1989）により記載されたプロトコールでモデル化された温度プログラムを開始する。そのプログラムは、最初にチャンバー250A-250Cを55℃の温度に加熱し、そして2分間その温度に維持する。次に、コントローラーは、72℃の複製温度（3分間維持される）および94℃のDNA融解温度（1分間維持される）の間の温度を繰返す。複製温度の後、25回インキュベーションが行われ、チャンバー250A-250C中の材料は、適当な増幅配列の存在について分析される。

8番目（120H2）、9番目（120I2）、13番目（120M2）および14番目（120N2）の流体チャンバーは、このプロトコールに使用されず、そして後反応操作のために入手可能である。それによって円形コンベヤーを回転した配列が、設計されて、核酸含有材料と接触していた内側リング表面140の部分は、陰性の対照反応が行われる反応チャンバーのための流体交換チャンネルによって回転するものはないことに注意する。汚染に対するPCR反応の感度に関してこの注意が望まれる。流体交換チャンネル231Dは、設置され、それで任意の流体交換ポート121-A2から121-R2と一列に配列される場合、流体交換チャンネル231A-231Cおよび232Cのうち一列に配列されるものはない。反応チャンバーのこれら2つの群の間の共同配列の欠如は、不注意に流体を混合するのを避ける。

### 実施例3-PCR増幅

最近、磁気性DNA結合ビーズが、溶解した細胞（例えば、ダインビーズ（D y n b e a d s）TMDNAディレクト（D i r e c t）TM（ニューヨーク、レイク・サクセスのダイナル））から放出されるDNAを結合する細胞溶解の段階で直接使用できることが示された。したがって、実施例2のプロトコールは、非常に簡便化できる。この実施例では、反応チャンバーディスク上の各反応チャンバーは、別の独立した組の流体チャンバーをそして適切であれば、個別の毛細管構造を有する。簡便性のために、以下に概略されるプロトコールは、1つの反応チャンバーおよびそれに関連した流体チャンバーおよび毛細管構造に焦点を置

く。プロトコールは以下のとおりである。

1. 毛細管構造160は、アッセイカセットのチャンバー250と一列に配列され、毛細管150中の血液サンプルは、空気圧を用いて第四のチャンバー250に押込まれる。(毛細管は、毛細管構造の出口を、反応チャンバーディスク上の流体交換チャンネル231に隣接して位置決めされた通風口[示されず]と一列に配列し、そして入口151を通して毛細管構造を満たすことによって、血液で満たされている。)血液サンプルのみが第四の反応チャンバーの量を半分満たす。チャンバー250は、 $50-100\mu\text{m}$ の直径を示す磁性の白血球細胞結合のビーズ(ニューヨーク、レイク・サクセスのダイナル)の供給により予め負荷がかけられ、そしてサンプルの量と等しい多量の溶解溶液が押出される。溶解溶液は、1.0% v/w ツイーン20(ミズーリー、セント・ルイスのシグマ・ケミカル・シーオー。)で補足された増幅緩衝液の2×溶液である。(この溶解溶液は、ダイナルによって提供される溶液に換えることができる。)溶解溶液を正しい位置に固定するために、円形コンベヤーを回転させて、チャンネル231を閉じる。チャンバー250の温度は、現在 $56^{\circ}\text{C}$ に維持される。
2. 45分後、円形コンベヤーを回転させて、チャンバー250を第一の流体チャンバー120Aと一列に配列される。それに、サンプルの細胞残渣を含有する溶解溶液が押出される。細胞DNAが結合されるDNA結合ビーズは、チャンバー250に残る。
3. 円形コンベヤーを回転して、チャンバー250を第二の流体チャンバー120Bと一列に配列し、そして増幅緩衝液(40mM NaCl、20mM トリス-HCl、pH8.3、5mM MgSO<sub>4</sub>)から構成される洗浄溶液が、チャンバー250に導入される。その後、円形コンベヤーを回転させて、チャンバー250を閉める。DNA結合ビーズを磁氣的に曝気する。
4. 10分後、円形コンベヤーを回転して、チャンバー250をチャンバー120Bと一列に配列させ、そして洗浄溶液が反応チャンバーの外に押出される。
5. 第三の流体チャンバー120Cを用いて、段階4および5を反復する。
6. その後、円形コンベヤーを回転して、チャンバー250を第四の流体チャン

バー120Dと一列に配列させ、それから増幅溶液（0.01% w/vゼラチン、0.1% v/wトリトンX-100（ミズーリー、セント・ルイスのシグマ・ケミカル・シーオー.））、必要とされるヌクレオチドトリホスフェート、標的配列（0.5  $\mu$ M）およびTaqポリメラーゼ（ウイスコンシン、マディソンのプロメガ・コープ.）を増幅するのに適切なプライマーを含む増幅溶液が押出される。

7. 円形コンベヤーを回転して、チャンバー250を閉じ、そして下部補助ブロックは、反応チャンバーディスクの下に位置づけられて、さらに厳密な温度制御を提供する。その後、コントローラーは、ウー（Wu）らのプロク. ナトル. アカデ. サイ. ユーエスエイ（Proc. Natl. Acad. Sci. USA）、86、2752-2760（1989）により記載されたプロトコールでモデル化された温度プログラムを開始する。そのプログラムは、最初にチャンバー250を55℃の温度に加熱し、そして2分間その温度に維持する。次に、コントローラーは、72℃の複製温度（3分間維持される）および94℃のDNA鎖分離温度（1分間維持される）の間の温度を繰返す。複製温度の後、25回インキュベーションが行われ、チャンバー250中の材料は、適当な増幅配列の存在について分析される。

本発明が好ましい実施態様に基づいて力点をおいて記載された一方で、好ましい組成物および方法での変数が使用できること、そして本発明がここで特に記載されたのより別のやり方で行えることを意図することは当業者には明らかである。したがって、本発明は、以下の請求項によって定義されたとおり本発明の概念および範囲内で包含された全ての改変を包含する。

本発明は、限定されないが、PCRアッセイのような、種々の法化学および診断生化学的アッセイを行う際に使用するのに適した効果的なバルブを有する経済的な高温微小反応器を提供する。微小反応器は、高蒸気圧が特に考慮される場合でさえ、自動化アッセイを行うのにも適切に適合される。

本発明は、（a）反応チャンバーを包含する第一のアセンブリー、および（b）温度制御のための第二のアセンブリー（ここで、第二のアセンブリーは、反応

チ

チャンバーに隣接して位置づけることができる。)を包含する反応チャンバー内に流体密閉の手段で温度が上昇する反応を行う系でもある。第一のアセンブリーは、複数の反応チャンバーを包含し、その各々は、流体交換チャンネルを有し、そして好ましくは、少なくとも3つのこのような反応チャンバーを包含する。第二のアセンブリーは、熱源、冷却槽、またはその両方、そして好ましくは流体回転翼を包含する。

このシステムは、第一のアセンブリーと接触して滑らせて位置決めでき、そして複数の流体チャンバーを含む第三のアセンブリーをも包含できる。各流体チャンバーは、流体交換ポートを有し、その複数の流体交換ポートは、第一のアセンブリー、および流体を、第一の流体交換チャンネルと一列に配列できる第一の交換ポートを有する流体チャンバーから、配列された第一の流体交換チャンネルの反応チャンバーに流れ出させる第一の流体回転翼に相対して第三のアセンブリーを滑らせて位置決めすることによって、第一の流体交換チャンネルと一列に配列できる。そして、ある実施態様では、流体に反応チャンバーを離れさせるための第二の流体回転翼である。

第一のアセンブリーは、第二のアセンブリーの範囲内に適合する。この組合せは、流体密閉である。ここで、第一および第三のアセンブリーは、互いに相対的に滑らすことができる。第一の流体交換チャンネルが第三のアセンブリー中の流体交換チャンネルと一列に配列されない場合、このような流体は、第一の流体交換チャンネルを通して流れない。さらに、第一のアセンブリーと第三のアセンブリーの間の流体密閉の封印は、流体の温度が約90℃から約100℃である場合に反応チャンバー中の流体を維持する際に効果的である。

別の実施態様は、外部の透過な壁を有する少なくとも1つの反応または流体チャンバーを包含する。本発明は、光を、反応または流体チャンバーの外部透過壁に向ける能力のある光源をも包含する。このような実施態様としては、(a)照明反応または外部透過壁を有する流体チャンバーから反射される光、(b)照明反応または外部透過壁を有する流体チャンバーを通して透過される光、または(c)外部透明壁を有する反応または流体チャンバー中の励起分子から発散する光放出を検出する能力のある光検出装置が挙げられる。

別の実施態様としては、第三のアセンブリーまたは第一のアセンブリーを滑らせる滑動、および（a）第三のアセンブリーまたは第一のアセンブリーの滑動、

および（b）流体を、流体チャンバーから反応チャンバーに流させるための第一の流体回転翼を制御するプロセッサが挙げられる。滑動は、第一および第三のアセンブリーの間の線状または環状の動きに影響する。

本発明としては、反応チャンバーの温度を監視する温度監視装置が挙げられる。他の実施態様としては、温度監視装置から信号を受け取り、そして熱源を制御するプロセッサが挙げられる。本発明の内容に使用される冷却槽は、プロセッサの制御下にもある。冷却槽は、循環液を含む導管を包含する。

別の実施態様としては、反応チャンバーに隣接して位置決めできる永久磁石、永久磁石を回転するターンテーブル、第一または第三のアセンブリーを滑らせるための滑動、および（a）第一のアセンブリーまたは第三のアセンブリーの滑動、（b）流体を、流体チャンバーから反応チャンバーに流させるための第一の流体回転翼、（c）熱源、および（d）磁石のターンテーブルを制御するプロセッサが挙げられる。

別の実施態様は、サンプルをここに記載されたアッセイシステムの第一の反応チャンバーに導入すること、および1つまたはそれ以上の流体チャンバーから、PCR反応を行うのに必要な試薬を含有する第一の反応チャンバー溶液に輸送することからなるPCR反応を行う方法に関する。好ましくは、アッセイシステムの第二のアセンブリーは、約5秒以内で約25℃から約75℃に温度を上昇させる。第二のアセンブリーは、約5秒以内で約75℃から約50℃に温度を降下させる。

本発明は、反応チャンバーの温度を迅速に調節する機構、（i）第一および第二のカバーを有し、第一および第二のカバーの間の間隔によって定義される厚みを有する反応チャンバーを包含する第一のアセンブリー、（ii）熱源、冷却槽、および第二のアセンブリーの表面に開く複数の加圧流体チャンバーを包含する第二のアセンブリー、および（iii）加圧流体チャンネル内で流体圧力を制御するための圧力コントローラーを包含するアッセイシステムを含む。ここで、第

二のアセンブリーは、加圧流体チャンネルが反応チャンバーのカバーと接触しているように、反応チャンバーに隣接して位置決めできる。第二のアセンブリーに含まれる熱源は、第二のアセンブリーに付属した少なくとも1つの電氣的加熱器を包含することが好ましい。第二のアセンブリーに含まれる冷却槽は、第二のアセンブリーに不可欠な水または他の流体についての導管および導管を通して流体を

流させる流体回転翼を包含するのが好ましい。

好ましくは、第一および第三のアセンブリーが、第二のアセンブリーと組合せて使用され、(i) 第一および第二の末端板（ここで、第一の末端板が反応チャンバーに隣接して位置決めできる。）および(ii) 第一および第二の末端板の間に位置決めされ、そして熱電氣的熱ポンプを形成する電氣的に直列に繋がった複数の対のp型およびn型の半導体ブロックを包含する。熱ポンプは、第一の極を示す電圧が直列に繋がった半導体ブロックにかけられる場合に、熱を第一の末端板から第二の末端板に、そして第一の極性に対峙する極の電圧が一連に繋がった半導体ブロックにかけられる場合に、熱を第二の末端から第一の末端板に吸い上げる。好ましくは、反応チャンバーの厚みは、約1mmまたはそれ以下である。

加圧された流体チャンネル中の流体が圧力を上昇させる場合に好ましい実施態様が使用され、そして第二のアセンブリーが反応チャンバーに隣接して位置決めされ、反応チャンバーに隣接して圧力が加えられる。第一のカバーが変形可能な材料から形成される場合にこの使用が増進され、ここで、第二のアセンブリーが第一のカバーに隣接して位置決めされる場合、複数の隣接通路を介して第一のカバーに対してかけられたガスの圧力は、反応チャンバーの幅を狭めるために第一のカバーを変形するのに有効である。したがって、第二のアセンブリーが第一のカバーに隣接して位置決めされる場合、および第二のアセンブリーの加圧された流体チャンネル中の流体が圧力を減少させる場合は、第一のカバーは、第二のアセンブリーに付着する。本発明は、第二のアセンブリーを第一のアセンブリーから移動させるトランスロケーターを包含するのが好ましい。ここで、第一のカバ



ーが第二のアセンブリーに付着される場合、第二のアセンブリーは、第二のアセンブリーを第一のアセンブリーから移動させることによって、第一のアセンブリーから移動できる。

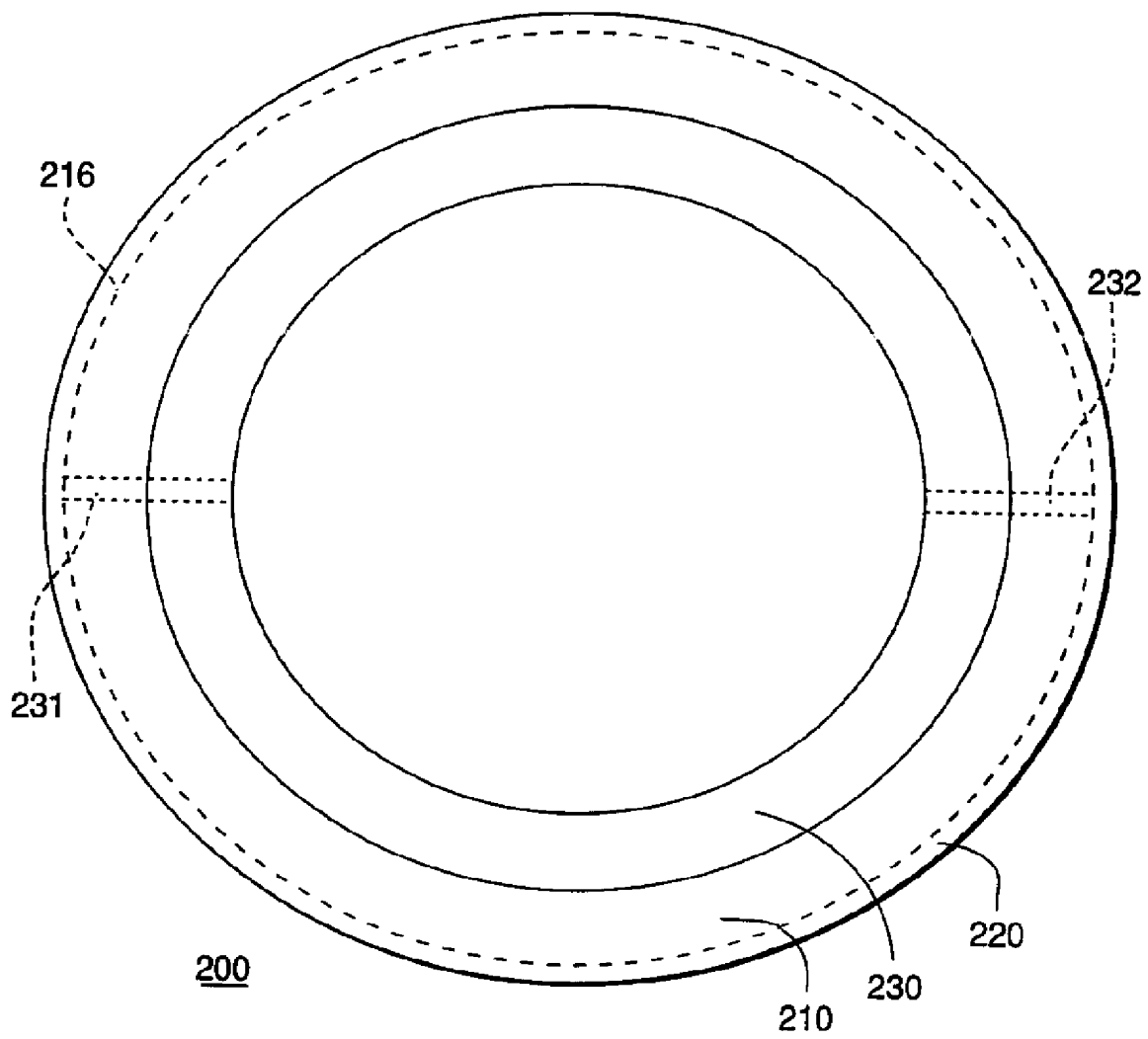
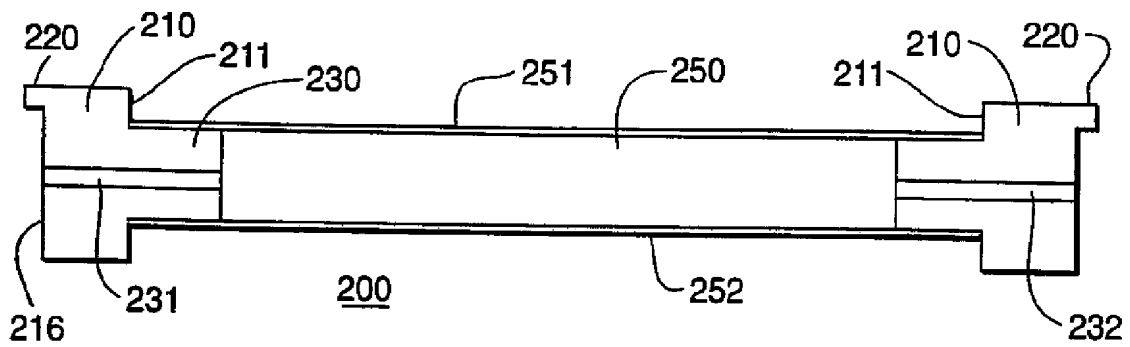
好ましい実施態様は、(a) 変形可能な材料から形成されたカバーを有する反応チャンバーおよび (b) 反応チャンバーの温度を迅速に調節する機構を包含する。この機構は、(i) 第一および第二の末端板（ここで、第一末端板は、該反応チャンバーカバーと接触して位置決めできる）、および (ii) 第一および第二末端板の間に位置決めされ、そして電氣的に一連に繋がって熱電氣的熱ポンプを形成した複数の対の p 型および n 型の半導体ブロックを包含する。ここで、熱ポンプは、第一の極を示す電圧が一連に繋がった半導体ブロックにかけられる場

合に、熱を第一の末端板から第二の末端板に、そして第一の極に対峙する極の電圧が一連に繋がった半導体ブロックにかけられる場合に、熱を第二の末端から第一の末端板に吸い上げる。

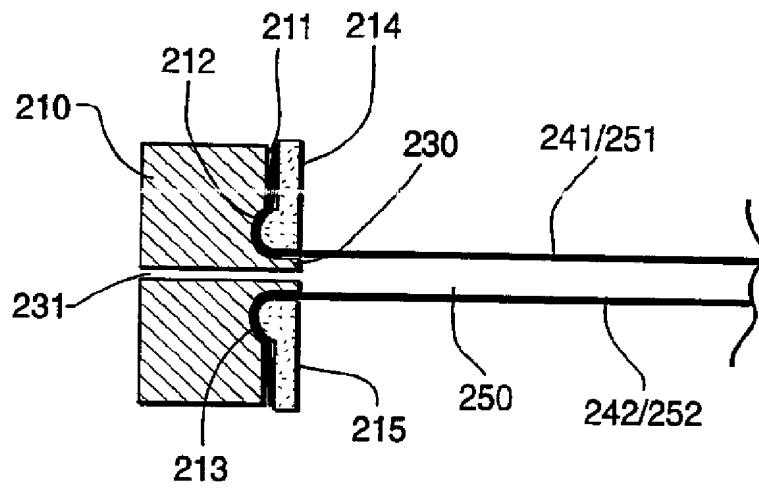
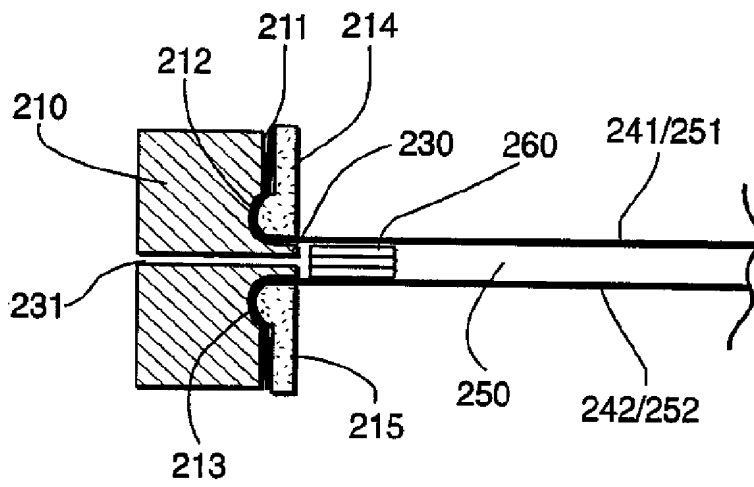
This diagram shows a cross-sectional view of a second embodiment of the device. It features a base layer 110 with a raised section 120 on the left. A curved component 121 is positioned on top of the raised section, with a layer 140 beneath it. A layer 122 is shown on the left side of the raised section, adjacent to the base layer 120. A small rectangular feature 111 is located on the right side of the base layer 110.

**FIG. 1B**

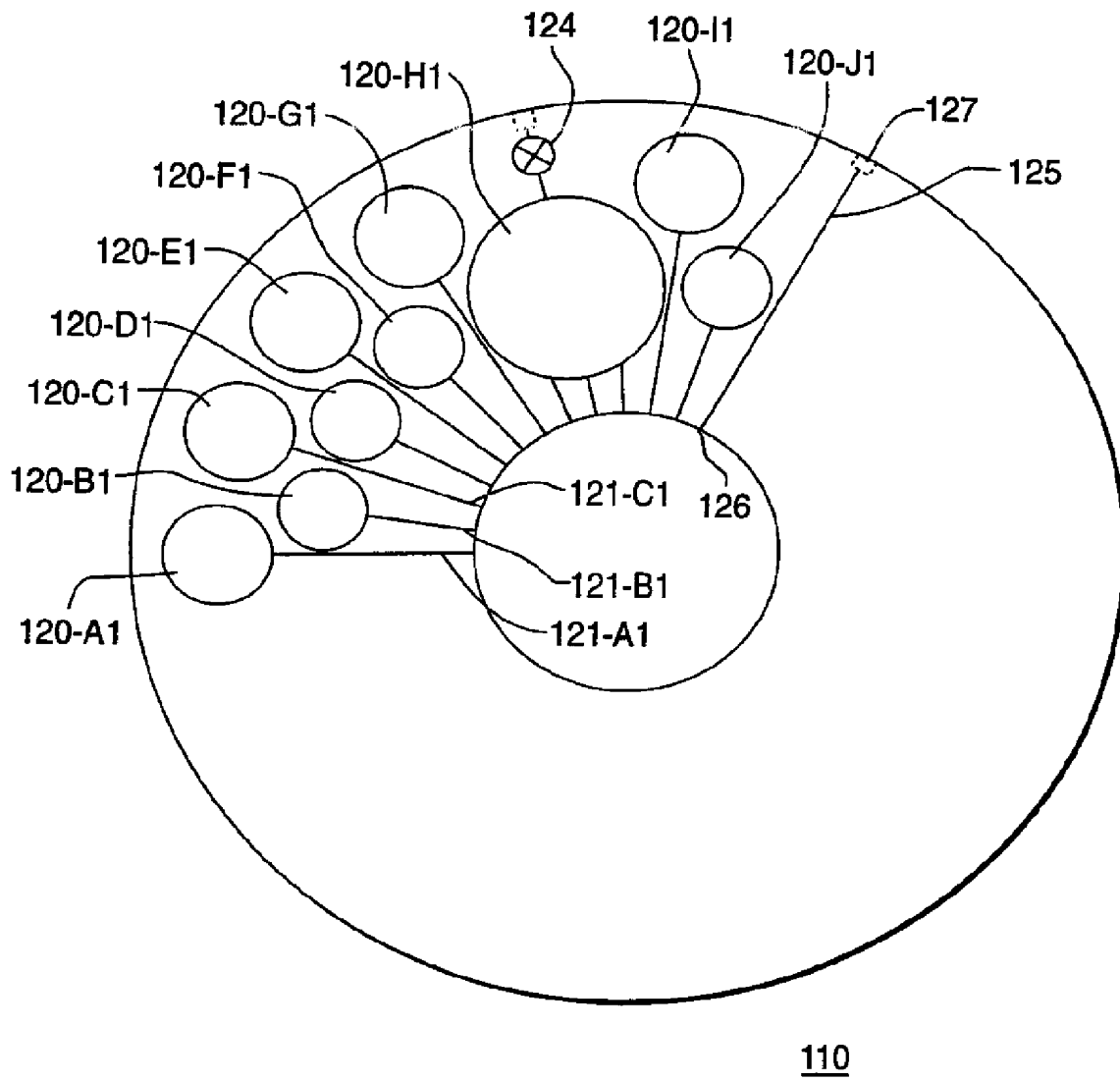
【図 2】

**FIG. 2A****FIG. 2B**

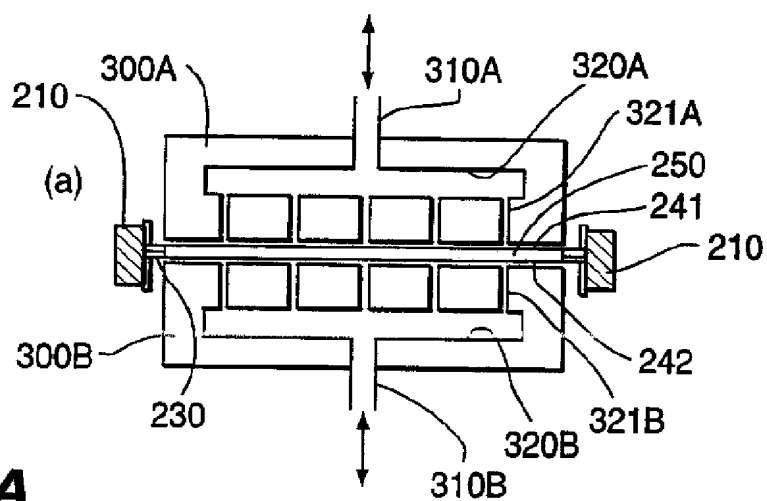
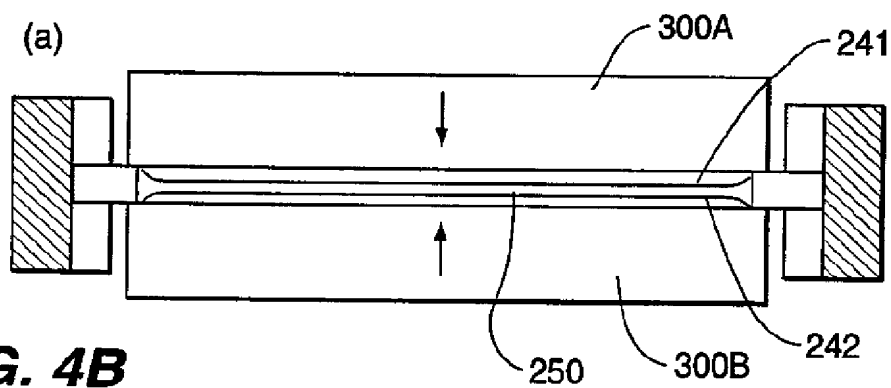
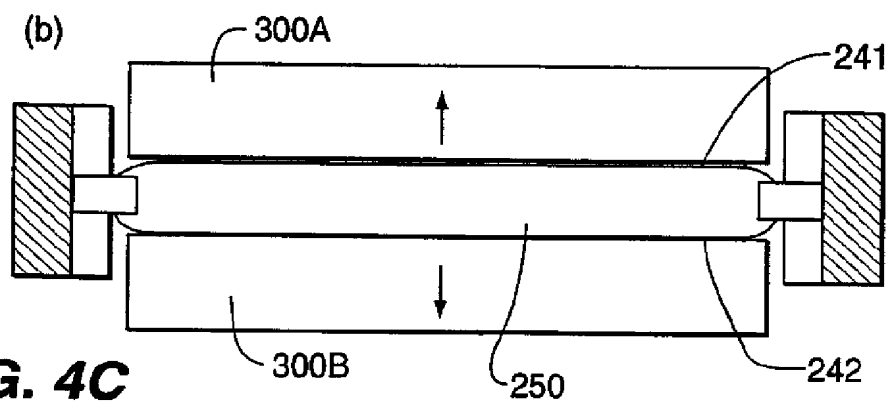
【図2】

**FIG. 2C****FIG. 2D**

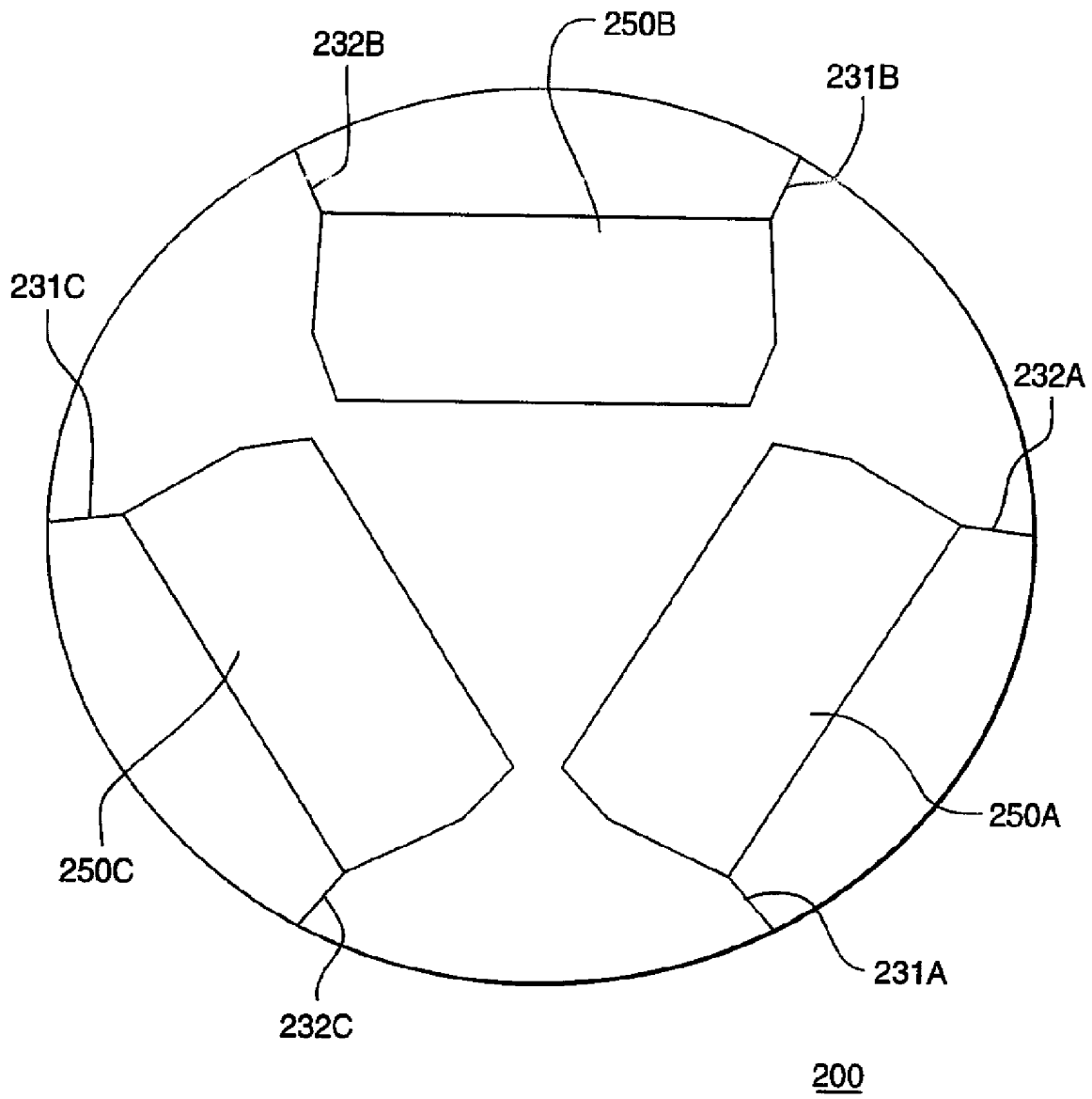
【図3】

**FIG. 3**

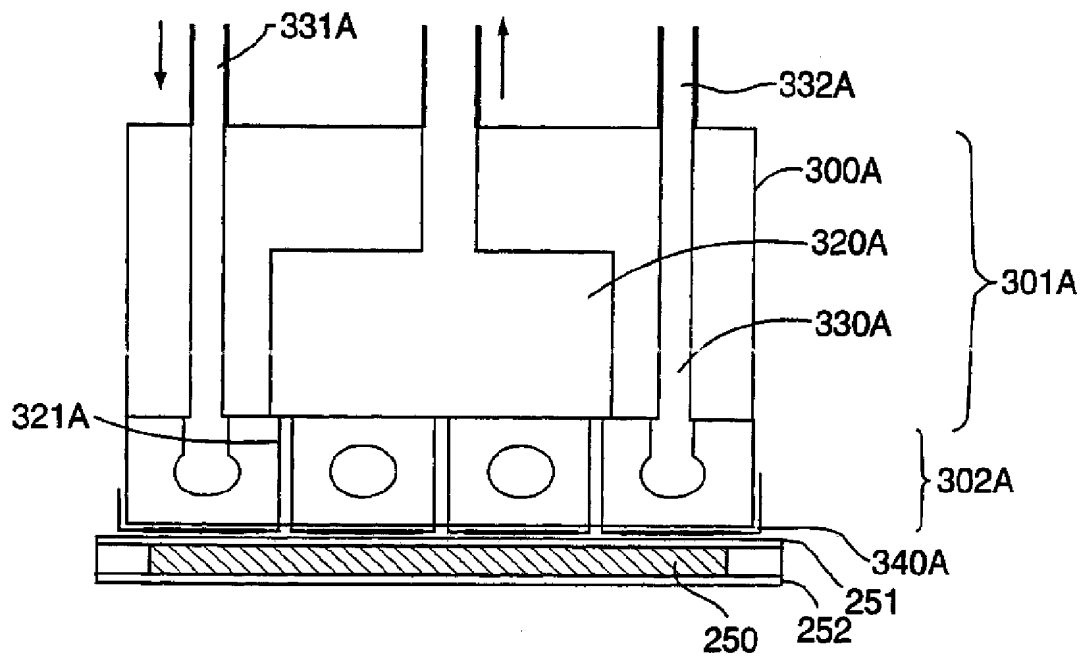
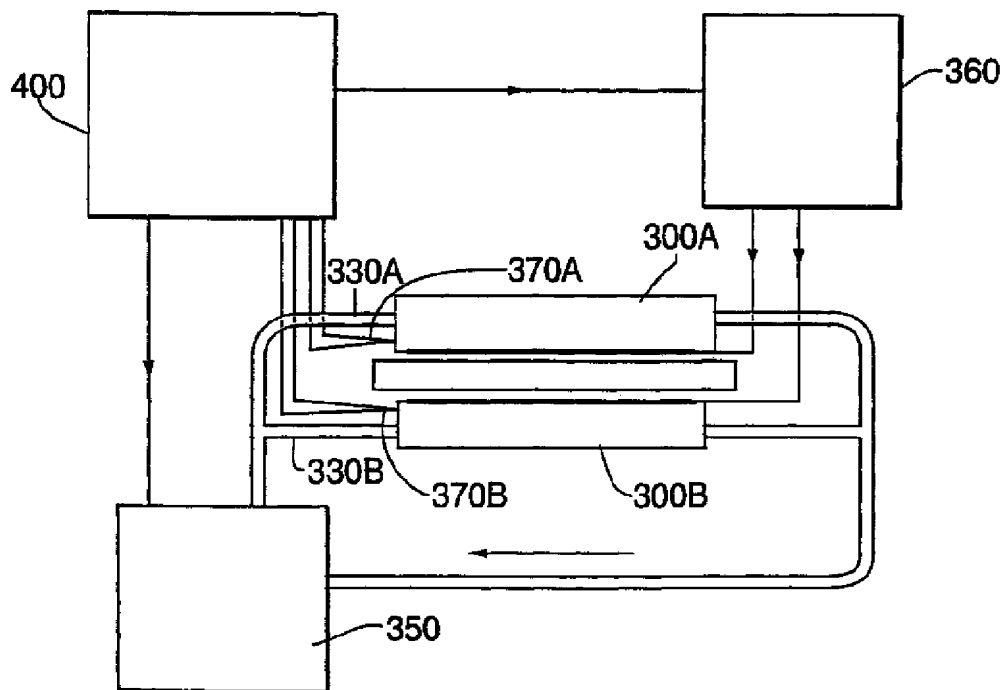
【図4】

**FIG. 4A****FIG. 4B****FIG. 4C**

【図5】

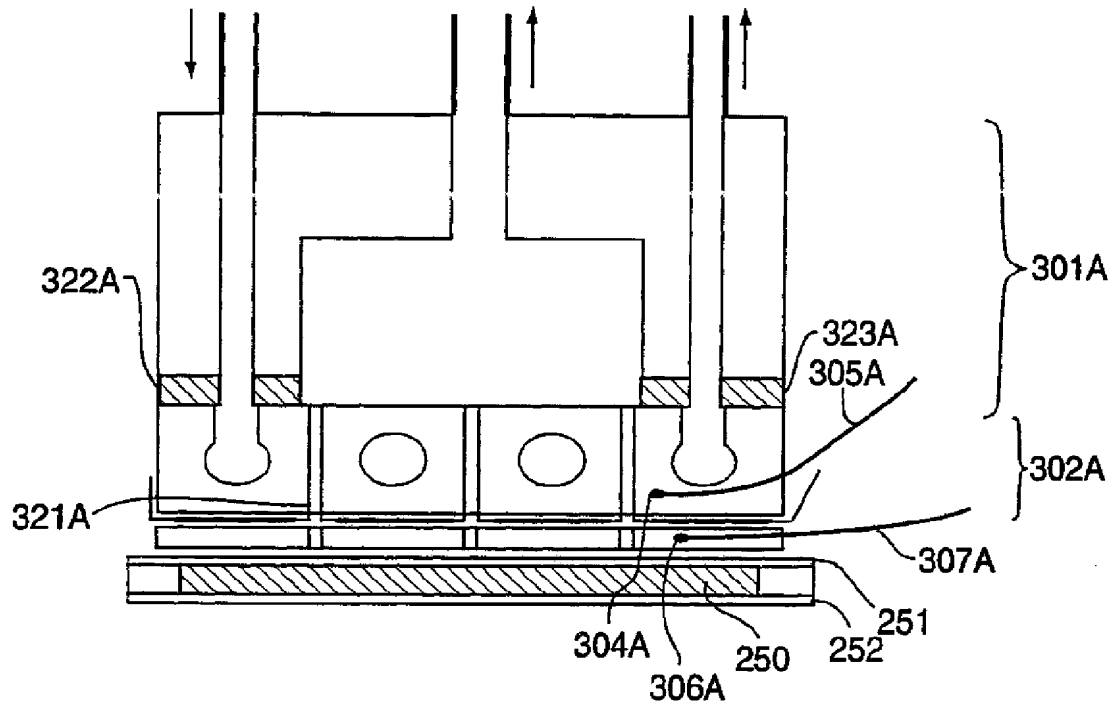
**FIG. 5**

【図 6】

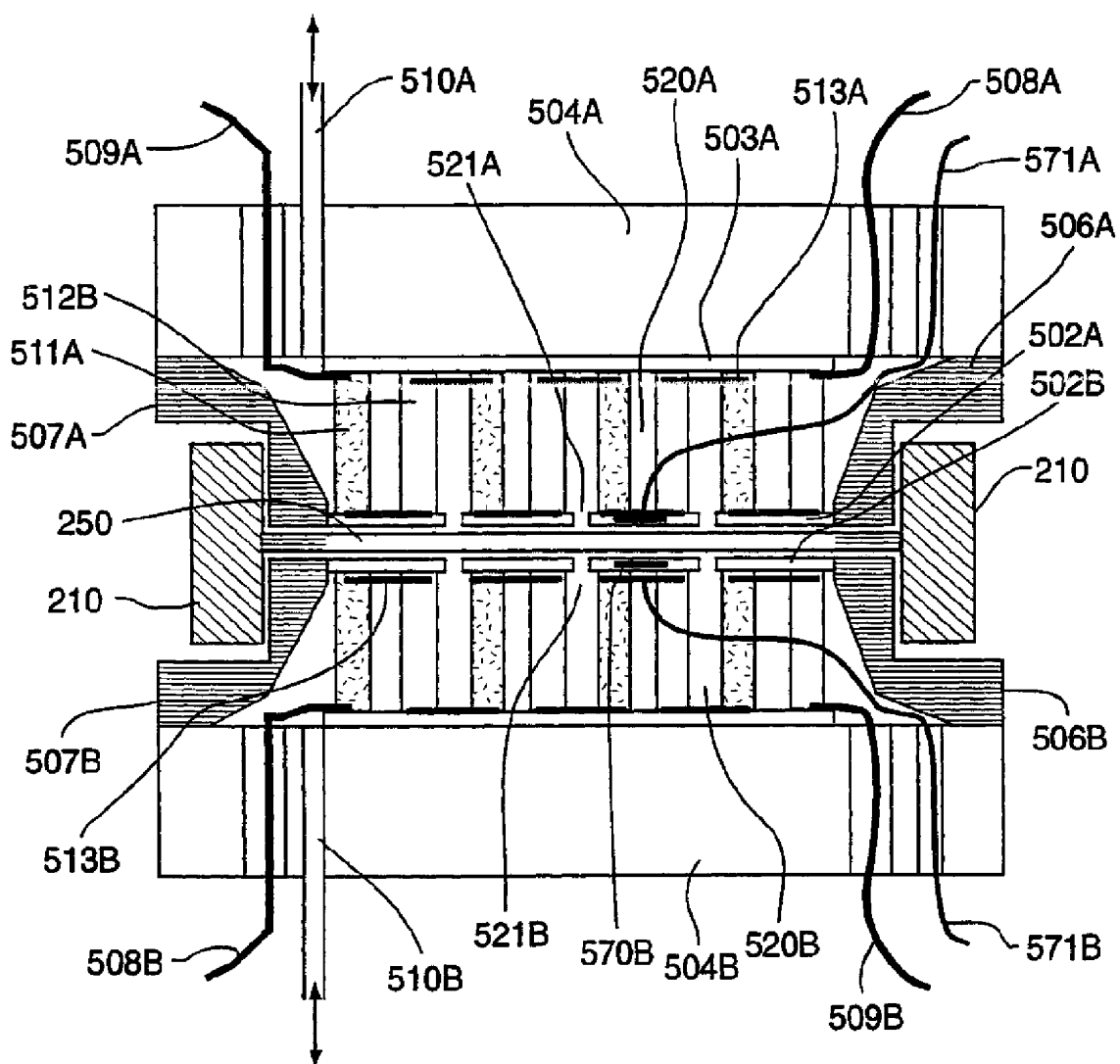
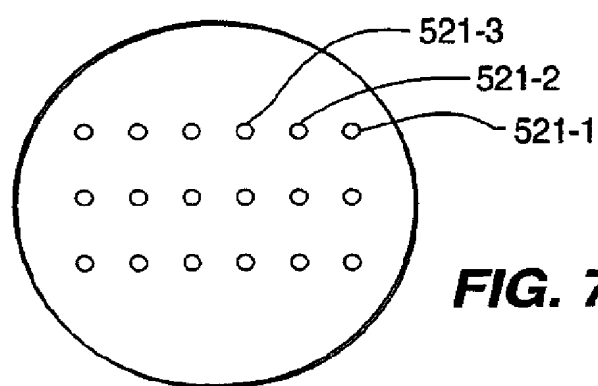
**FIG. 6A****FIG. 6B**



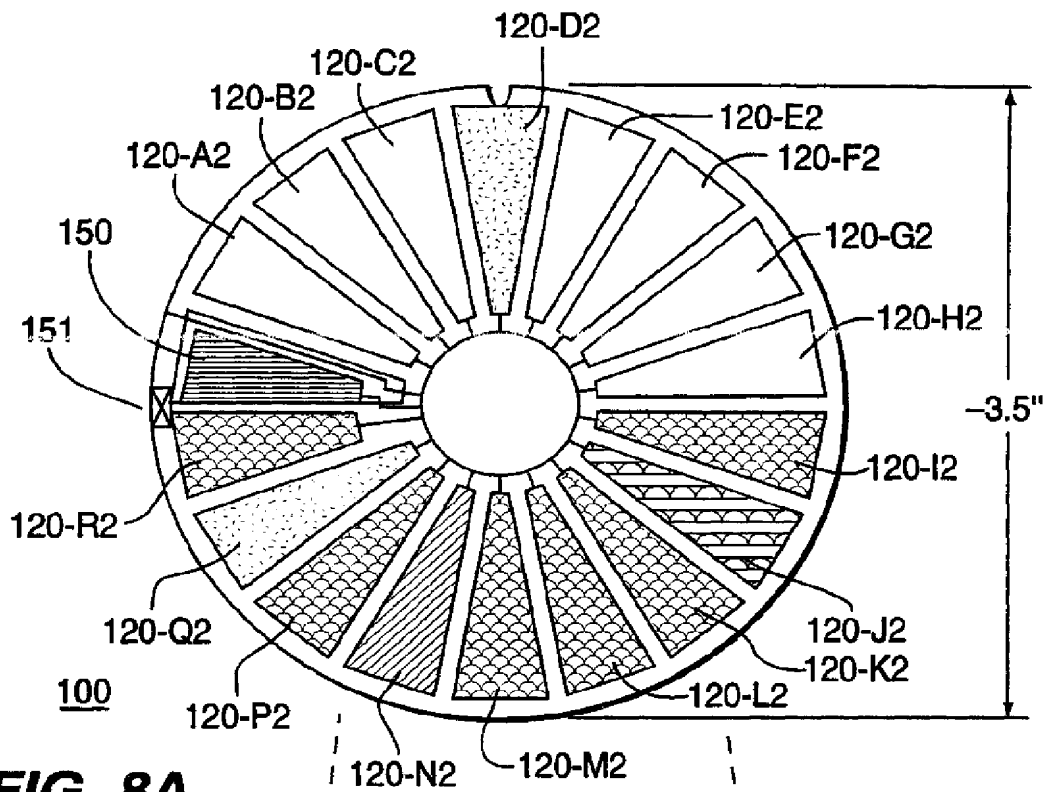
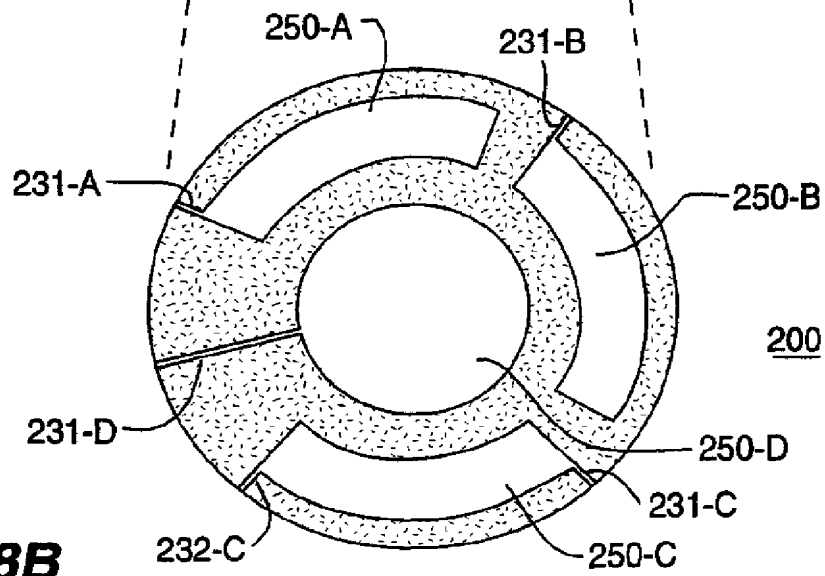
【図 6】

**FIG. 6C**

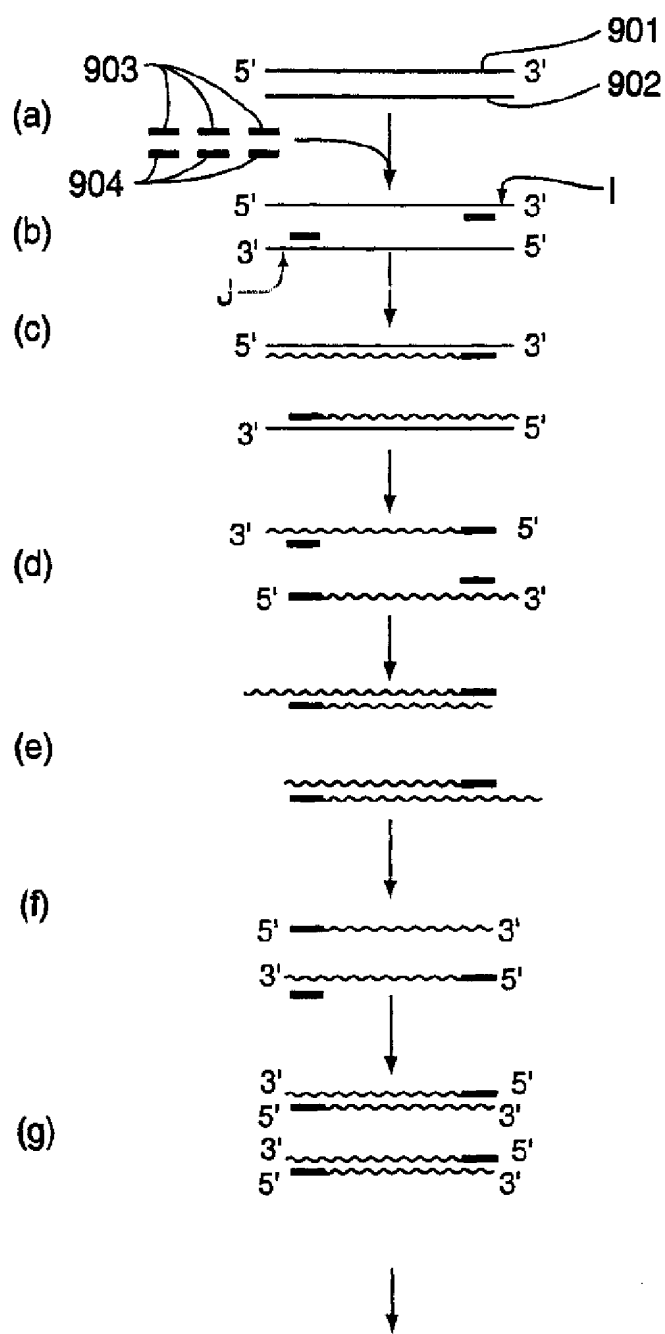
【図7】

**FIG. 7A****FIG. 7B**

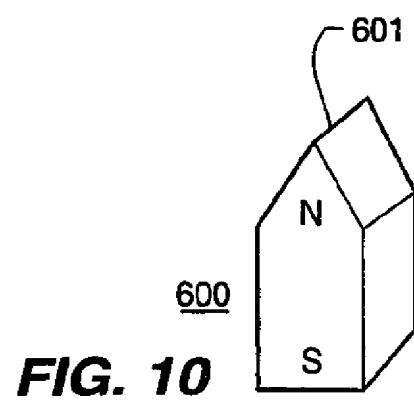
【図 8】

**FIG. 8A****FIG. 8B**

【図9】

**FIG. 9**

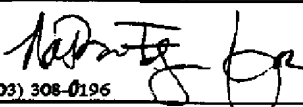
【図 10】



## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US96/17116

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC(6) : Please See Extra Sheet. US CL : 435/91.2, 289, 290, 291; 422/99, 68.1, 58, 189 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 435/91.2, 289, 290, 291; 422/99, 68.1, 58, 189 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Please See Extra Sheet.		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 5,460,780 A (DEVANEY, JR. ET AL.) 24 October 1995, see abstract and columns 1-3.	1-11
A	US 5,176,203 A (LARZUL) 05 January 1993, see abstract and Figures 1-3.	1-11
Y	US 5,415,839 A (ZAUN ET AL.) 16 May 1995, see abstract.	1-11
A	US 5,422,271 A (CHEN ET AL.) 06 June 1995, see abstract.	1-11
A	US 5,451,500 A (STAPLETON) 19 September 1995.	1-11
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance. "B" earlier document published on or after the international filing date. "L" document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified). "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means. "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed. "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention. "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone. "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "Z" document member of the same patent family.		
Date of the actual completion of the international search 13 JANUARY 1997		Date of mailing of the international search report 03 FEB 1997
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703) 305-3230		Authorized officer DIANNE REES  Telephone No. (703) 308-0196

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/US96/17116

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER:**

IPC (6):

C12P 19/34; C12M 1/36, 1/38, 1/34; B01L 3/00; G01N 33/00, 21/00; B01J 8/04

**B. FIELDS SEARCHED**

Electronic data bases consulted (Name of data base and where practicable terms used):

APS, BIOSIS, BIOTECHABS, BIOTECHDS, BIOBUSINESS, CAPLUS, CABA, EMBASE, MEDLINE,  
SCISEARCH, USPATFULL, WPIDS, JAPIOsearch terms: PCR or Amplification apparatus, or thermocycler, or heat block, or temperature control unit, and  
slideable, or sliding, or pistons, or movable, fluid or liquid or sample exchange or fluid or liquid or sample delivery,  
processor, semiconductor blocks, heat sources, cooling sink, thermoelectric heat pump

---

フロントページの続き

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テーマコード (参考)
G 0 1 N 33/566		G 0 1 N 33/566	
(81)指定国	EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), AM, AT, AU, B, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, HU, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LK, LR, LT, LU, LV, MD, MG, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, TJ, TM, TT, UA, UG, UZ, VN		
(72)発明者	サウスゲート, ピーター, ディー. アメリカ合衆国 ニュージャージー州 モンマウス ジャンクション リッジ ロード 958		
(72)発明者	ザンズッチ, ピーター, ジェイ. アメリカ合衆国 ニュージャージー州 ローレンスヴィル ジル アヴェニュー 13		